

Tesis de Posgrado

Efecto de paration, malation, clordano, lindano y endosulfan sobre el camino metabólico del hemo

Vila, María del Carmen

1986

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Vila, María del Carmen. (1986). Efecto de paration, malation, clordano, lindano y endosulfan sobre el camino metabólico del hemo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1976_Vila.pdf

Cita tipo Chicago:

Vila, María del Carmen. "Efecto de paration, malation, clordano, lindano y endosulfan sobre el camino metabólico del hemo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1976_Vila.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

E F E C T O D E P A R A T I O N , M A L A T I O N , C L O R D A N O ,
L I N D A N O Y E N D O S U L F A N S O B R E E L C A M I N O
M E T A B O L I C O D E L H E M O .

María del Carmen Vila

Director de Tesis: Dra. Leonor C. San Martín de Viale

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1986

Tesis 1976
ej. 2

A mi padre .

" In memoriam "

Aunque no puedas verlo este trabajo está especialmente dedicado a vos que no pudiste terminar de estudiar pese a la insistencia de tus maestros, quienes rápidamente notaban y se asombraban de tu capacidad.

Sea este mi reconocimiento a quien tanto hizo para que yo estudiara.

A mi madre y a mi hermana .

Porque han recorrido conmigo el camino, no siempre fácil, de los años de estudio alentándome y ayudándome en todo momento.

A E d u a r d o :

Al esposo,
al amigo,
al compañero.

Porque él tiene mucho que ver con este logro
y con muchos otros logros de mi vida.

A m i h i j a : J u l i a .

Que ha venido muy recientemente a embellecer
mi vida y darme un motivo más para luchar y ceer en el mañana.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Leonor C. San Martín de Viale por haberme formado como investigadora y haberme facilitado los medios que permitieron realizar el presente trabajo.

A la Sra. Carmen Aldonatti por haber colaborado en los experimentos con lindano y por estar siempre dispuesta a dar una mano.

A Cristina Taira, con quien hemos realizado alguno de los experimentos, Silvia Billi, Rosa Wainstok de Calmanovici, María del Carmen Ríos de Molina y Eduardo T. Cánepa por su compañerismo, su disposición a ayudar y su constante estímulo.

A Marta Mazzetti, Adriana Umansky, Yolanda Sopena, los integrantes del laboratorio de Esteroides y de Biología Molecular por su permanente buena predisposición a colaborar.

A la Cátedra de Toxicología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por haber realizado las cromatografías gaseosas.

Al Dr. Alberto A. Viale y la Lic. Claudia Tomes por su ayuda con los cultivos de *Escherichia coli*.

A la Dra. Ana Silvia Haedo por el asesoramiento estadístico.

Al Sr. Francisco Ortega por su colaboración en el mantenimiento de las ratas.

A la Sra. Liliana Inés Vázquez por el trabajo dactilográfico.

A todos los integrantes del Departamento de Química Biológica que me han acompañado a lo largo de estos años de trabajo.

Al CONICET por haberme otorgado las becas que permitieron concretar el presente trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por haberme dado el lugar de trabajo.

INDICE

INTRODUCCION .

| | | |
|--------|--|----|
| I | - CAMINO BIOSINTETICO DEL HEMO | 1 |
| I-1. | Biosíntesis de ALA | 4 |
| I-2. | Biosíntesis de PBG | 11 |
| I-3. | Biosíntesis de Uroporfirinógeno | 16 |
| I-4. | Transformación de Uro'gen III en Copro'gen III..... | 22 |
| I-5. | Transformación de Copro'gen III en Proto'gen IX | 25 |
| I-6. | Formación de Proto IX | 28 |
| I-7. | Transformación de Proto IX en Hemo | 29 |
| II | - REGULACION DEL CAMINO BIOSINTETICO DEL HEMO | 32 |
| II-A | REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE ALA-S HEPATICA | 32 |
| II-B | REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE ALA-S EN TEJIDOS DISTINTOS DEL HEPATICO | 40 |
| III | - PORFIRIAS EXPERIMENTALES | 41 |
| III-1. | Efecto del AIA sobre la biosíntesis del hemo | 42 |
| III-2. | Efecto del DDC sobre la biosíntesis del hemo | 46 |
| III-3. | Efecto del HCB sobre la biosíntesis del hemo | 49 |
| IV | - LINDANO, CLORDANO, ENDOSULFAN, PARATION Y MALATION .. | 52 |
| | Objetivos | 56 |

PARTE EXPERIMENTAL .

| | |
|------------------|----|
| MATERIALES | 59 |
|------------------|----|

| | |
|---|----|
| METODOS | 65 |
| I - TRABAJO CON EMBRIONES | 65 |
| I-1. Tratamiento de los animales | 65 |
| I-2. Contenido de porfirinas en el hígado | 67 |
| I-3. Determinación de ALA-S | 68 |
| I-4. Fraccionamiento subcelular..... | 69 |
| I-5. Determinación de ALA-S con agregado de Succinil CoA-Sintetasa | 71 |
| I-6. Obtención de Succ CoA-S | 72 |
| I-7. Determinación de Succ CoA-S | 73 |
| I-8. Determinación de proteínas | 74 |
| I-9. Determinación de Succínico Deshidrogenasa | 75 |
| I-10. Determinación de Glutamato Deshidrogenasa | 76 |
| I-11. Determinación de ferroquelatasa | 77 |
| II - TRABAJO CON RATAS | 78 |
| II-1. Tratamiento de los animales | 78 |
| II-2. Preparación de las resinas Dowex | 79 |
| II-2a. Resina aniónica | 79 |
| II-2b. Resina catiónica | 79 |
| II-3. Determinación de ALA y PBG y porfirinas en orina | 80 |
| II-4. Regeneración de las resinas | 82 |
| II-5. Determinación de COPRO y PROTO en heces | 82 |
| II-6. Determinación del contenido de porfirinas en el hígado | 84 |

| | |
|--|----|
| II-7. Determinación de ALA-S..... | 84 |
| II-8. Determinación de PCL..... | 84 |
| II-9. Preparación de uroporfirinógeno III..... | 86 |
| II-10. Esterificación de las porfirinas..... | 87 |
| II-11. Pasaje a cloroformo..... | 88 |
| II-12. Identificación de las porfirinas. Cromatografía en papel de sus ésteres metílicos..... | 88 |
| III - TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS..... | 90 |

RESULTADOS Y DISCUSION.

| | |
|---|-----|
| I - EFECTO DE: CLORDANO, ENDOSULFAN, PARATION Y MALATION SOBRE EL CONTENIDO DE PORFIRINAS Y LA ACTIVIDAD DE ALA-S EN HIGADO DE EMBRIONES DE POLLO. RESULTADOS..... | 91 |
| I -1. CONTENIDO HEPATICO DE PORFIRINAS..... | 91 |
| I -1a. Efecto del clordano sobre el contenido hepático de porfirinas..... | 91 |
| I -1b. Efecto del endosulfan sobre el contenido hepático de porfirinas..... | 94 |
| I -1c. Efecto del paratió sobre el contenido hepático de porfirinas..... | 96 |
| I -1d. Efecto del malatió sobre el contenido hepático de porfirinas..... | 101 |

| | | | |
|--------|------|---|-----|
| I | -2. | ACTIVIDAD DE ALA-S..... | 105 |
| | | DISCUSION..... | 108 |
| II | - | EVALUACION DE LA CAPACIDAD PORFIRINOGENICA DEL LINDANO EN RATAS. | |
| | | RESULTADOS..... | 113 |
| II | -1. | EFFECTO DEL LINDANO SOBRE LA EXCRECION DE PORFIRINAS Y PRECURSORES..... | 113 |
| II | -1a. | Excreción de ALA y PBG en orina..... | 113 |
| II | -1b. | Excreción de porfirinas en orina..... | 116 |
| II | -1c. | Excreción de Copro y Proto en heces..... | 116 |
| II | -2. | EFFECTO DEL LINDANO SOBRE LA ACTIVIDAD HEPATICA DE ALA-S y PCL..... | 119 |
| | | DISCUSION..... | 122 |
| III- | | ESTUDIOS SOBRE EL AUMENTO DE ALA-S PRODUCIDO POR MALATION. | |
| | | RESULTADOS..... | 127 |
| III-1. | | Efecto de la variación del tiempo de tratamiento de los embriones con malati6n sobre la actividad de ALA-S..... | 127 |
| III-2. | | Efecto de la variaci6n del tiempo de incubaci6n de la reacci6n enzimática sobre la formaci6n de ALA:.... | 129 |
| III-3. | | Efecto de los inhibidores de la sntesis protéica sobre el aumento de ALA-S producido por malati6n.... | 129 |

| | |
|--|-----|
| III-3a. Efecto de cicloheximida sobre el aumento de ALA-S producido por malatión..... | 131 |
| III-3b. Efecto de Actinomicina D sobre el auemtno de ALA-S producido por malatión..... | 133 |
| III-4. Efecto de hemina sobre el aumento de ALA-S produci <u>i</u> do por malatión..... | 142 |
| III-5. Efecto del agregado de malatión "in vitro" sobre la actividad de ALA-S normal..... | 145 |
| III-6. Efecto del FB sobre el aumento de ALA-S producido por malatión..... | 145 |
| III-7. Efecto de malatión sobre la actividad hepática de ferroquelatasa..... | 150 |
| III-8. Estudios sobre la distribución subcelular de la ac <u>u</u> tividad de ALA-S..... | 150 |
| DISCUSION..... | 157 |
| CONCLUSIONES..... | 165 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 168 |

ABREVIATURAS .

| | |
|-----------|--|
| A | : $-\text{CH}_2-\text{COOH}$. |
| Act D | : Actinomicina D. |
| AIA | : Alilisopropilacetamida. |
| ALA | : Acido δ -aminolevulínico. |
| ALA-S | : ALA-Sintetasa. |
| ALA-D | : ALA-Dehidrasa. |
| ATP | : Adenosina-5'-trifosfato. |
| cDNA | : DNA copia. |
| CH | : Cicloheximida. |
| Copro | : Coproporfirina. |
| Copro'gen | : Coproporfirinógeno. |
| Copro-O | : Coproporfirinógeno-oxidasa. |
| DDC | : 3,5 dietoxycarbonil-1,4-dihidrocolidina. |
| DMSO | : Dimetilsulfóxido. |
| EDTA | : Acido etilendiaminotetraacético. |
| FB | : Fenobarbital. |
| FQ | : Ferroquelatasa. |
| GDH | : Glutamato Deshidrogenasa. |
| HCB | : Hexaclorobenceno. |
| Me | : $-\text{CH}_3$. |
| mRNA | : RNA mensajero. |
| P | : $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ |
| PBG | : Porfobilinógeno. |

| | | |
|--------------|---|--|
| PBG-asa | : | Porfobilinogenasa. |
| PBG-D | : | PBG-Deaminasa. |
| PCL | : | Porfirinógeno Carboxilasa. |
| PPyr | : | Fosfato de piridoxal. |
| pre ALA-S | : | precursor de ALA-S. |
| Proto | : | Protoporfirina. |
| Proto'gen | : | Protoporfirinógeno. |
| Proto-O | : | Protoporfirinógeno-Oxidasa. |
| RMN | : | Resonancia magnética nuclear. |
| SDH | : | Succínico Deshidrogenasa. |
| SDS | : | Dodecil sulfato de sodio. |
| SKF 525A | : | clorhidrato de 2,2 dietil-aminoetil-2,2-difenil-valera |
| Succinil-CoA | : | Succinil coenzima A. |
| Succ CoA-S | : | Succinil CoA-Sintetasa. |
| TCA | : | Acido tricloroacético. |
| Uro-CoS | : | Uroporfirinógeno III Cosintetasa. |
| Uro'gen | : | Uroporfirinógeno. |
| V | : | -CH=CH ₂ . |

INTRODUCCION

I - CAMINO BIOSINTETICO DEL HEMO.

La biosíntesis del hemo es de fundamental importancia en la naturaleza ya que el hemo forma parte de moléculas tan importantes para la vida como: hemoglobina, citocromos, catalasa y muchas otras hemoproteínas.

En los últimos 40 años, gracias al desarrollo de técnicas radioisotópicas, se han podido dilucidar los diferentes pasos de este camino biosintético. Ya en 1946, Shemin y Rittenberg (1, 2) encontraron que después de administrar glicina marcada isotópicamente aparecía marcación del grupo hemo de la hemoglobina circulante.

Estudios posteriores demostraron que los 4 átomos de Nitrógeno (1, 3, 4) y 8 de los átomos de Carbono del Hemo (4 - 6) derivan de la glicina (Figura 1). El resto de los átomos de Carbono provienen de un intermediario de 4 carbonos del Ciclo de Krebs, presumiblemente Succinato (4).

Shemin y Russel (4, 7) sugirieron que el intermediario que se formaba a partir de la condensación de Glicina y Succinato era el ácido δ -aminolevulínico (ALA).

Este hecho quedó confirmado por la utilización de ALA(5- ^{14}C) por un hemolizado de eritrocitos de pato (8). Se postuló entonces la formación de ALA a partir de Glicina y Succinil Coenzima A (Succinil-CoA), éster activado de Succinato, y la posterior formación del pirrol precursor Porfobilinógeno (PBG) (7, 9, 10).

Figura 1: MARCACION OBTENIDA EN LA MOLECULA DE HEMO A PARTIR DE GLICINA 2- ^{14}C .

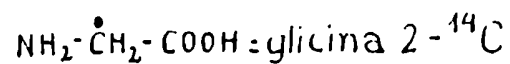
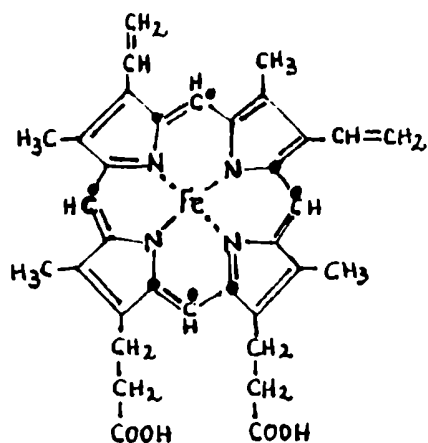
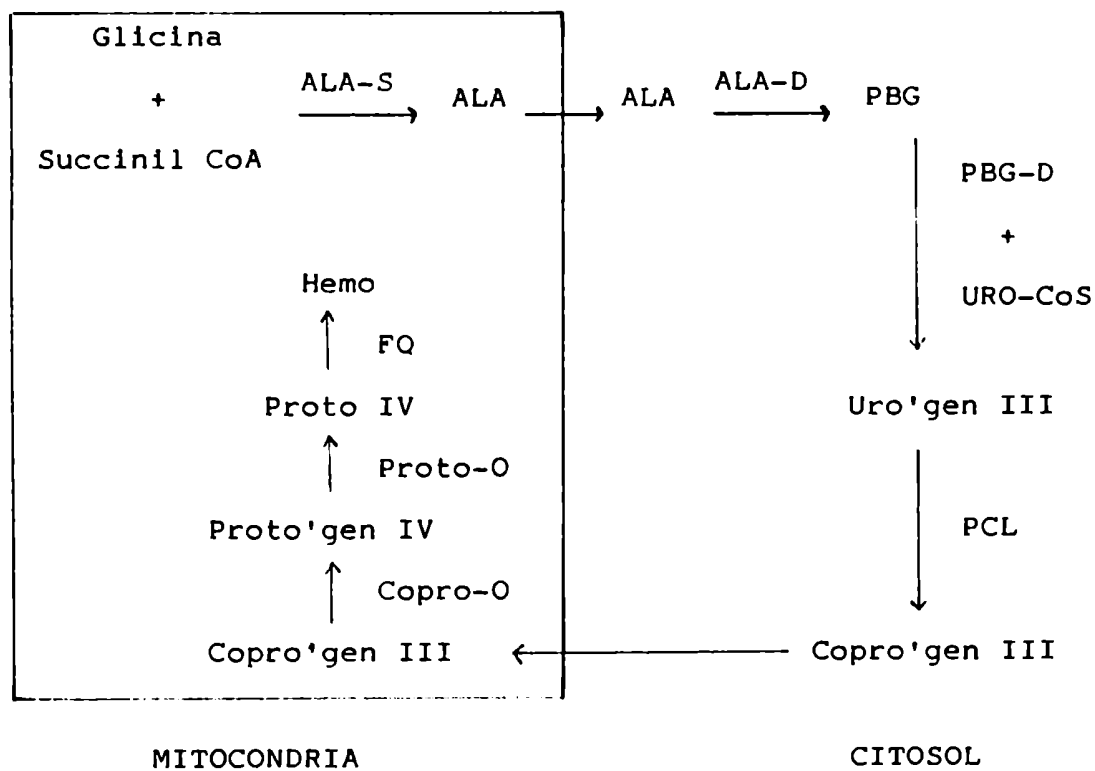


Figura 2. CAMINO BIOSINTETICO DEL HEMO Y SU COMPARTIMENTALIZACION.



Por lo tanto el primer paso de este camino metabólico, que se muestra en la Figura 2, es la formación de ALA a partir de Glicina y Succinil-CoA. Esta reacción está catalizada por una enzima mitocondrial el ALA-Sintetasa (ALA-S).

Luego 2 moléculas de ALA se combinan para dar 1 molécula de PBG obteniéndose así el pirrol precursor. Esta reacción ocurre en el citosol y está catalizada por la enzima ALA-Dehidrasa (ALA-D).

El paso siguiente, que también tiene lugar en el citosol, consiste en la condensación de 4 moléculas de PBG para dar el primero tetrapirrol: Uroporfirinógeno III (Uro'gen III). En esta reacción participan 2 enzimas la Uroporfirinógeno I Sintetasa también llamada PBG Deaminasa (PBG-D) y la Uroporfirinógeno III Cosintetasa (URO-CoS) o Uroporfirinógeno III Isomerasa. A continuación una enzima soluble, la Porphirinógeno Carboxilasa (PCL) descarboxila los 4 grupos acetilos del Uro'gen III para dar Coproporfirinógeno III (Copro'gen III).

Las siguientes reacciones tienen lugar en la mitocondria. Allí, por intermedio de la Coproporfirinógeno-Oxidasa, (Copro-O), el Copro'gen III sufre una descarboxilación oxidativa de los grupos propiónicos de los anillos A y B para dar Protoporfirinógeno IX (Proto'gen IX), el cual se oxida a Protoporfirina IX (Proto IX) por acción de la Protoporfirinógeno-Oxidasa (Proto-O).

Finalmente la Ferroquelatasa (FQ) cataliza la inserción de Fe^{2+} en Proto IX para dar Hemo.

I - 1. Biosíntesis de ALA.

Como ya se ha visto el ALA-Sintetasa (ALA-S) cataliza la formación de ALA a partir de Succinil-CoA, que proviene principalmente del Ciclo de Krebs, y Glicina (Figura 3).

Esta enzima requiere Fosfato de Piridoxal (PPyr) como cofactor.

El mecanismo propuesto consiste en la formación inicial de un tiohemiacetal entre la enzima y el PPyr, formándose luego una base de Schiff con Glicina que se condensa con Succinil-CoA. Finalmente se obtiene ALA por descarboxilación del grupo COOH de la glicina (11).

Se encontró (12) que una vez unida la glicina al PPyr se pierde el H pro R de la glicina originando un carbanión (II) que reacciona con Succinil-CoA para producir ácido α amino β cetoadípico (III) que se descarboxila, resultando un complejo enzima-PPyr-ALA (IV) el que por hidrólisis produciría ALA libre como se muestra en la Figura 4.

La formación de ALA "in vitro" a partir de Glicina y Succinil-CoA fue demostrada en distintos tipos de células que incluyen bacterias fotosintéticas (13) y no fotosintéticas (14) y en distintos tejidos de aves y mamíferos (15, 16).

En las células eucariotas, esta reacción catalizada por el ALA-S, tiene lugar en la matriz mitocondrial (17, 18), como era de esperar, ya que es en esta organela donde se genera el Succinil-CoA.

Esta enzima también ha sido encontrada en el citosol (19). En realidad el ALA-S funciona en la matriz mitocondrial pero es codificada por un gen nuclear y sintetizada en los polisomas libres como un precursor citosólico (pre ALA-S) de mayor PM que la enzima mitocondrial madura (20 - 22). El precursor es procesado a la forma mitocondrial madura durante la translocación a la mitocondria (23).

ALA-S ha sido purificada a partir de *Rhodopseudomonas spheroides* (24) y de citosol (25, 26) y mitocondrias (21, 26 - 29) de aves y mamíferos.

La enzima citosólica de hígado de rata fue purificada parcialmente (25). Esta enzima requiere una alta concentración catiónica (equivalente a NaCl 0,3 M) para su máxima activación y estabilización de su actividad; el pH óptimo es de 7,5. Los Km aparentes para Glicina, Succinil-CoA y el cofactor PPyr son respectivamente 10^{-2} ; 7×10^{-5} y 3×10^{-6} M. No se encuentra actividad cuando se reemplaza Glicina por Alanina o Serina. Respecto a la especificidad por Succinil CoA se vió que al ser reemplazado por propionil CoA o acetil CoA se forman aminoacetonas a una velocidad menor al 1% de la de su sustrato normal. Cuando se purifica ALA-S de mitocondria o citosol de hígado de rata se forman agregados o complejos con otras proteínas y exhibe una amplia variedad de PM (desde 70.000 hasta 650.000 estimados por tamizaje molecular) de acuerdo a las condiciones experimentales (25, 30 - 32).

Este problema fue superado mediante una digestión con papáina de estos agregados de alto PM (33); de modo que la enzima que

dó libre de otras proteínas y no hubo prácticamente pérdida de la actividad enzimática cuando se hizo la digestión en presencia de cantidades suficientes de PPyr y Glicina. De este modo se obtuvo un PM mínimo de 51.000 por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS; pero cuando se estimó el PM por centrifugación en gradiante de densidad de Sacarosa, la enzima purificada mostró un PM de 110.000.

Estos resultados fueron obtenidos tanto para la enzima soluble como la mitocondrial. Aparentemente la enzima consistiría en 2 subunidades idénticas de PM 51.000.

Sin embargo trabajos más recientes de ese mismo laboratorio (34) han demostrado que la enzima citosólica tiene un PM mínimo de 75.000. Si a esta enzima se la deja en frío un cierto período de tiempo se convierte en la forma de PM mínimo 51.000, lo que sugiere que es muy susceptible a proteasas endógenas. Por otro lado se volvió a determinar el PM mínimo de la enzima mitocondrial y resultó ser de 66.000.

Cabe señalar que se purificó a partir de mitocondria de hígado de rata una proteína capaz de activar a ALA-S (35). Es posible que el activador sea una de las proteínas catalíticamente inactivas asociadas a ALA-S y que su modo de acción sea a través de la formación de agregados de alto PM de ALA-S a partir de monómeros catalíticos (35).

Existen también varios informes en la literatura sobre la purificación y caracterización de la enzima de pollo y embrión de

pollo.

Watanabe y colab. (26) determinaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS que la enzima purificada a partir de mitocondria de hígado de pollo tiene un PM mínimo de 65.000, que es igual al de la enzima nativa.

La enzima purificada del citosol tiene un PM mínimo 71.000 algo menor que el estimado para la nativa (PM mínimo = 73.000).

Trabajando con hígado de embrión de pollo Ades y Harpe (21) encuentran para la enzima mitocondrial PM mínimo = 63.000 y la soluble PM mínimo = 75.000 en tanto que Borthwick y colab. (28) encuentran que la enzima purificada de mitocondria tiene PM mínimo = 68.000 mientras que el precursor tiene PM mínimo = 74.000. Cabe señalar que estos últimos autores observaron que la enzima purificada de mitocondria de PM mínimo = 68.000 puede ser degradada proteolíticamente a una forma de PM alrededor de 50.000 conservando toda la actividad enzimática, lo cual justificaría los resultados de Whiting y Granick (27) quienes encuentran un PM de 49.000 para la subunidad de la enzima purificada de mitocondria de embrión de pollo; esta enzima estaría parcialmente degradada ya que ALA-S es sensible a proteasas endógenas (28, 36). En cuanto a la diferencia de PM observada (21, 26, 28) si bien por un lado no se sabe si la enzima de embrión de pollo es igual a la de pollo adulto, aún para embrión de pollo se encuentran estas pequeñas diferencias.

Estas podrían justificarse teniendo en cuenta por un lado, que ALA-S puede ser parcialmente degradada por proteasas endógenas

y, por otro lado que son distintas las condiciones de las electroforesis realizadas en cada caso así como las enzimas marcadoras empleadas para determinar el PM.

Por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa y por entrecruzamiento con glutaraldehído se encontró que ALA-S purificada de citosol y mitocondria tiene un PM de 140.000 es decir, que ambas se encontrarían en forma de dímero (26, 28), más aún, el ALA-S sintetizado recientemente en un sistema libre de células también existe como dímero (26).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por estudios de microscopía electrónica de la enzima purificada de embrión de pollo que determinaron que la molécula de ALA-S consta de 2 subunidades idénticas y curvadas asociadas con polaridades opuestas; el PM de cada subunidad se estimó en 70.000 (37).

En un trabajo muy reciente (38) se ha clonado y secuenciado el cDNA que codifica el precursor de ALA-S de hígado de embrión de pollo. Por lo tanto se ha determinado la secuencia de aminoácidos del precursor y se ha visto que se corresponde con la secuencia de aminoácidos de péptidos derivados de la enzima madura purificada de mitocondria.

El precursor de PM: 70.029 consta de 635 aminoácidos incluye 579 aminoácidos correspondientes a la enzima madura (PM: 63.903) más una extensión N-terminal de 56 aminoácidos. Estos PM son similares a los anteriormente citados (21, 26, 28).

La presecuencia de 56 aminoácidos tiene un caracter marcada

mente básico al igual que otras preproteínas mitocondriales estudiadas (39).

El significado de este carácter básico no está claro aún pero es probable que juegue algún rol en la interacción del precursor con receptores de la membrana externa (40).

Durante el transporte a la mitocondria los precursores son cortados por una proteasa localizada en la matriz (41). Comparando los sitios de corte de la molécula se ve que la proteasa no reconoce una unión específica sino que corta después de un aminoácido sin carga (40, 42). Esto ocurre con el precursor de ALA-S que se parte después de un residuo de glutamina; este mismo aminoácido se encuentra en el lugar de corte de la ornitina-carbamoyltransferasa humana (40).

Por otro lado, un análisis preliminar de la secuencia de un cDNA de ALA-S de rata muestra un alto grado de homología en los aminoácidos con la enzima de pollo según estos mismos autores (38).

La formación de ALA es decisiva para la biosíntesis de hemo ya que ALA-S es la enzima de velocidad limitante de este camino metabólico (16). Este es el único sitio donde se requieren cofactores derivados de Vitamina y donde se debe entregar energía. Las reacciones subsiguientes del camino parecen estar fuertemente favorecidas desde el punto de vista termodinámico y son virtualmente irreversibles.

Por otro lado, en hígado de animales normales la actividad de esta enzima se mantiene muy baja pero puede ser muy incrementada.

da por administración de diversas drogas y esteroides (16, 43 - 46) y está sujeta al efecto glucosa (44, 46). Entre las drogas más utilizadas en animales de experimentación para producir este aumento de actividad figuran: alilisopropilacetamida (AIA) y 3,5-dietoxi carbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) (47, 48). Además la actividad de esta enzima está elevada en ciertas porfirias humanas transmitidas genéticamente (49, 50).

I - 2. Biosíntesis de PBG.

ALA dehidrasa (ALA-D) es una enzima citosólica que cataliza la conversión de 2 moléculas de ALA en el pirrol PBG con la consecuente pérdida de 2 moléculas de agua (Figura 5) (51 - 53).

PBG es el precursor inmediato de las estructuras tetrapirrólicas de hemo, clorofila y corrinas (54).

Esta enzima ha sido purificada de varias fuentes entre las que se encuentran: hígado bovino (55 - 57), bacterias fotosintéticas (58), eritrocitos de rata, conejo (59) y humanos (60 - 62).

La enzima de mamíferos parece ser un octámero de PM alrededor de 280.000 (57, 59) constituida por 8 subunidades iguales de PM 35.000.

El ALA-D de eritrocitos humanos fue purificada 9.000 veces obteniéndose una proteína electroforética e inmunológicamente pura. El pH óptimo de la enzima es 6,6 y el Km para ALA $4,8 \times 10^{-4}$ M (62). Es una enzima sulfhidrúlica y es sensible a reactivos tiólicos y metales pesados (63 - 65). Es inhibida por reactivos de grupos

Figura 5: REACCION DE FORMACION DE PBG.

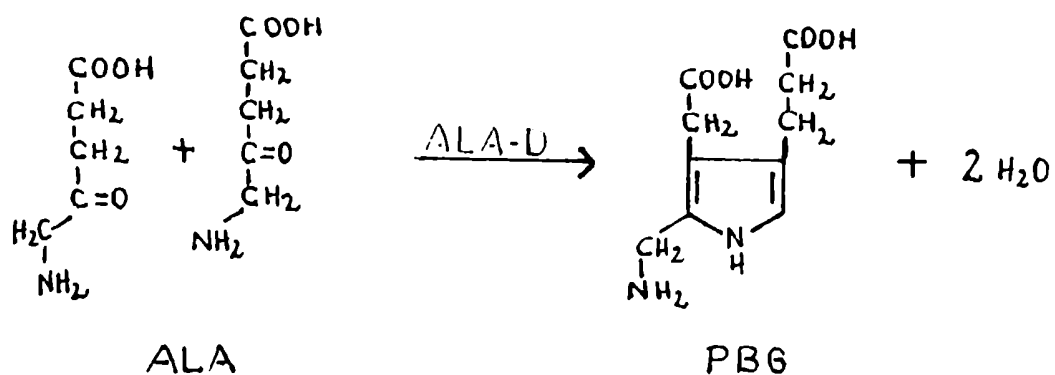
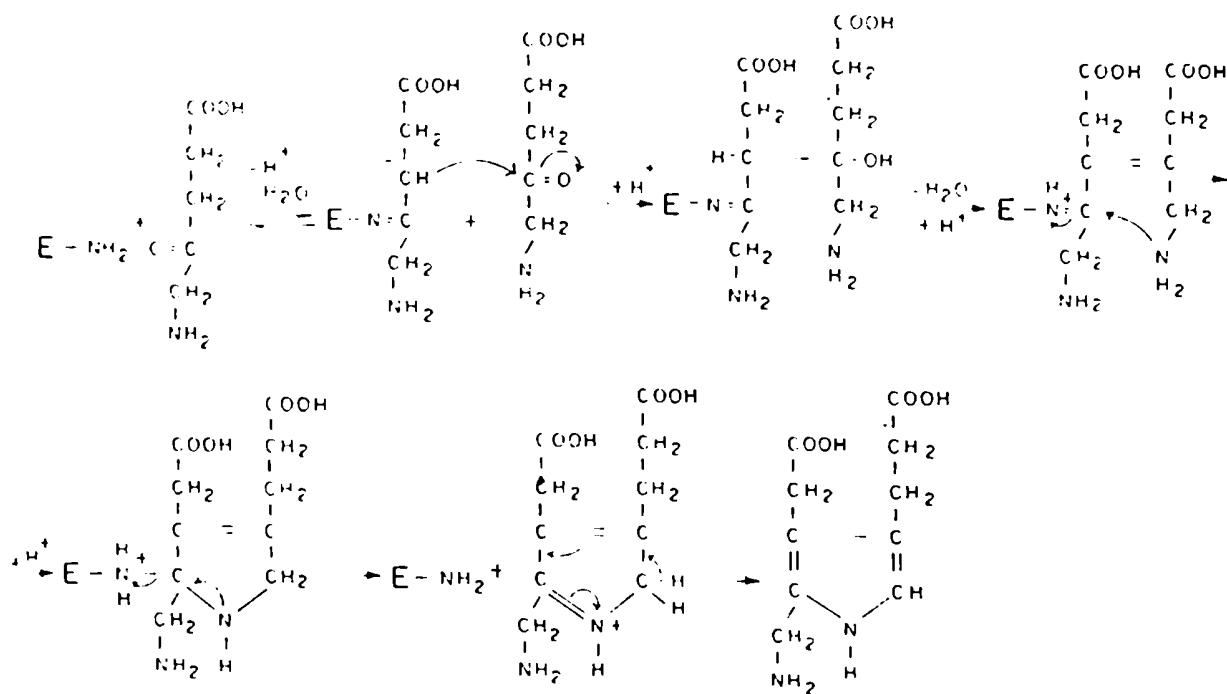


Figura 6: MECANISMO DE LA SINTESIS DE PBG POR ACCION DE ALA-D
PROPUESTO POR NANDI Y SHEMIN (71).



sulfhidrilos como p-Cloromercuribenzoato, ácido Iodoacético, Iodoacetamida (66 - 68).

El ALA-D de todas las fuentes estudiadas hasta el presente requiere la presencia de tioles exógenos como 2-Mercaptoetanol o Ditiotreitól para una actividad máxima (51); en ausencia de éstos el Oxígeno causa una inactivación reversible de la enzima, sin embargo se puede recuperar totalmente la actividad reincubando la enzima oxidada con tioles.

Se observó marcada inhibición de ALA-D de distintas fuentes de mamíferos con el quelante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (64). Estudios con enzima purificada sugieren que el Cinc es esencial para la actividad enzimática. La purificación de la enzima y el tratamiento con quelantes lleva a una apoenzima libre de metales la cual puede ser activada por la adición de Cinc (69).

Estudios de unión con $^{65}\text{Zn}^{2+}$ permitieron establecer que hay 8 átomos de Zn unidos por molécula de enzima de eritrocitos humanos (70).

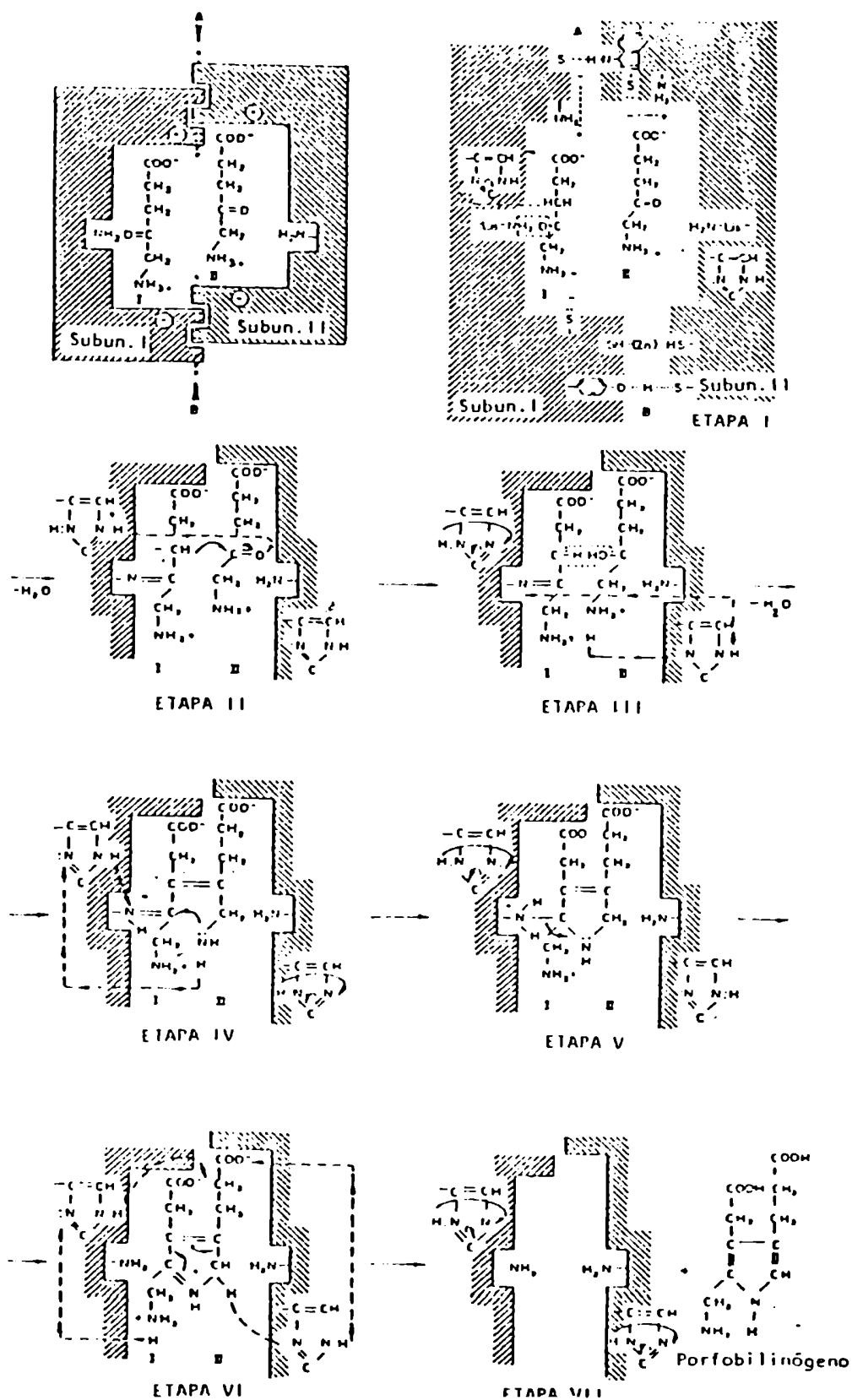
El mecanismo de esta reacción fue estudiado por Nandi y Shemin (71) usando la enzima de *Rhodopseudomonas spheroides*. Estos autores propusieron que primero un residuo de lisina del sitio activo forma una base de Schiff con la molécula de ALA que va a dar origen al lado correspondiente a la cadena de ácido acético del PBG, y luego se produce una condensación aldólica con una segunda molécula de ALA, que daría origen a la porción de PBG que contiene la cadena de ácido propiónico (Figura 6).

Este mecanismo sugiere el requerimiento de varias secuencias de protonación y desprotonación. Teniendo en cuenta que se encontraron residuos de cisteína de alta reactividad en el sitio activo, éstos podrían participar en la catálisis ácido-base. Cada grupo B^- o BH (posiblemente anión tiolato y tiol respectivamente) debería alternar su estado ácido-base durante la catálisis. Un modo conveniente de obtener esto es mediante un puente imidazólico para regenerar el estado requerido. Consistente con esta propuesta es la observación que un residuo de histidina es esencial para la actividad enzimática (56, 72). En base a estos hechos Barnard y colab. propusieron otro mecanismo (68). Posteriormente también basándose en el esquema postulado por Nandi y Shemin y teniendo en cuenta el rol de histidina en la transferencia de protones desde y hacia el sitio activo así como el requerimiento mínimo de un dímero para que haya actividad enzimática (73), Batlle y Stella (72) postularon el mecanismo que se muestra en la Figura 7.

Trabajando con la enzima de hígado bovino se encontró que la enzima de mamíferos también forma una base de Schiff con una de las moléculas de sustrato (74, 75). Usando la enzima de hígado bovino Jordan y Seehra (75, 76) demostraron que la primera molécula de ALA que se une al sitio activo de la enzima de hígado bovino se incorpora en el lado del pirrol que contiene la cadena de ácido propiónico.

No se habían realizado estudios mecanísticos sobre la enzima humana hasta que, en el año 1985, Jordan y Gibbs (77) propusieron

Figura 7: MECANISMO DE LA SINTESIS DE PBG POR ACCION DE ALA-D
PROPUESTO POR BATTLE Y STELLA (72).



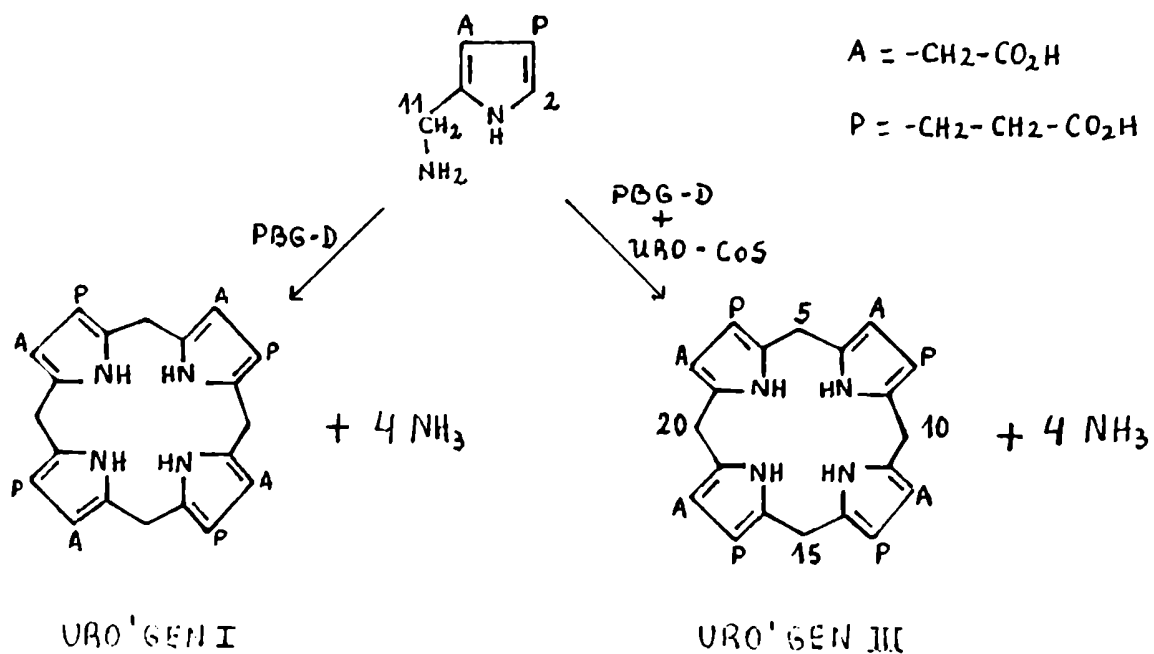
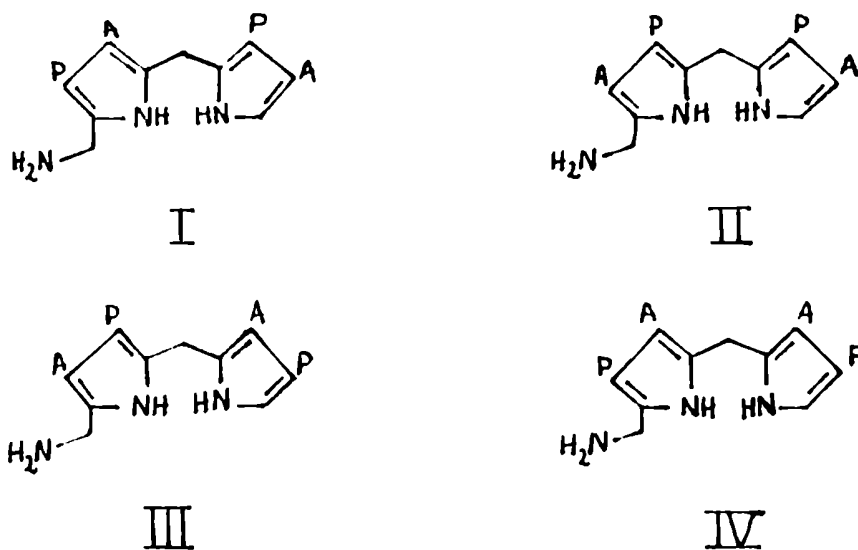
un mecanismo para la formación de PBG por el ALA-D de eritrocitos humanos en el cual la primera molécula de ALA que se une a la zona P del sitio activo (que es la que va a dar la porción correspondiente a la cadena de ácido propiónico del PBG) forma una base de Schiff con un grupo amino reactivo. A continuación se adiciona una segunda molécula de sustrato a la zona del sitio activo que va a formar la porción de la molécula de PBG que contiene al ácido acético, lo que lleva finalmente a la formación del producto PBG. Este mecanismo primeramente propuesto por Jordan y Seehra (75,76) difiere del mecanismo propuesto por Nandi y Shemin (71) en el orden de adición de la dos moléculas de ALA a la enzima.

I - 3 . Biosíntesis de Uroporfirinógeno .

La formación de Uro'gen III a partir de PBG está catalizada por un complejo enzimático llamado Porfobilinogenasa (PBG-asa) compuesto por 2 enzimas: la PBG-Deaminasa (PBG-D) que es una proteína termoestable y la Urogen III Cosintetasa (URO-CoS) que es una proteína termolábil.

La PBG-D cuando actúa sola cataliza la condensación cabeza a cola de 4 moléculas de PBG para dar Uro'gen I (Figura 8) y se liberan 4 moléculas de NH_3 . Para que se forme el Uro'gen III se requiere además la URO-CoS (Figura 8).

La PBG-D ha sido purificada de varias fuentes: Rhodopseudomonas spheroides (78, 79), euglena gracilis (80), semillas de callos de soja (81), eritrocitos humanos (82) y de aves (83), hígado

Figura 8: REACCION DE FORMACION DE URO'GEN I Y III.Figura 9: ESTRUCTURAS DE LOS POSIBLES DIPYRRILMETANOS INTERMEDIARIOS.

de rata (84) y bovino (85), hojas de espinaca (86) y bazo de ratón (87).

La enzima parece ser un monómero cuyo PM en *Euglena gracilis* es de 41.000 ± 2.000 (80) que es similar al de *Rhodopseudomonas spheroides* : 36.000 (78, 79) y hojas de espinaca: 38.000 - 40.000 (86) pero diferente al hallado para la enzima de eritrocitos humanos 25.000 ± 5.000 (82).

La enzima es inhibida por reactivos de grupos sulfhidrilos (79, 82). El pH óptimo es de 7,2 en callos de semilla de soja (81) y 7,6 en *Rhodopseudomonas spheroides* (79).

La URO-CoS ha sido purificada de callos de semillas de soja (81), bazo de ratón (88), hígado bovino (85) y de rata (89), germen de trigo (86), *Euglena gracilis* (90) y eritrocitos humanos (91).

La enzima es inhibida por reactivos de grupos sulfhidrilos (82) y por metales divalentes como: Zn^{2+} , Cd^{2+} y Cu^{2+} (89). La URO-CoS de eritrocitos humanos es un monómero de PM= 45.000 ± 5.000 (91).

Por estudios de biosíntesis de Uro'gen III a partir de (2,11- ^{13}C) PBG y utilizando espectros de RMN de ^{13}C , se determinó que el reordenamiento intramolecular ocurre en el anillo D y el carbono reordenado aparece en el puente C 15. Mientras que en la biosíntesis de Uro'gen I catalizada por PBG-D no ocurren reordenamientos (92).

Se vió que en la biosíntesis de Uro'gen III el reordenamiento no ocurre a nivel del monopirrol (92).

Para evaluar si el reordenamiento ocurría a nivel del dipirrol, los 4 posible dipirril metanos (Figura 9) fueron sintetizados en varios laboratorios y se estudió su incorporación en las porfirinas de tipo III en presencia del sistema PBG-D y URO-CoS.

El grupo de Frydman (93-95) encontró que el dipirrol III en presencia de PBG es convertido por la PBG-D en Uro'gen I pero no es incorporado a Uro'gen III por el complejo PBG-D + URO-CoS. En cambio cuando incuban el dipirrol IV con las 2 enzimas en presencia de PBG, éste se incorpora en Uro'gen III, por lo que sugieren que el reordenamiento ocurre a nivel del primer dipirrol.

Estos autores proponen que la URO-CoS interactuaría con la PBG-D comportándose como una proteína modificadora de ésta, cambiando el mecanismo de condensación del PBG desde el comienzo, dirigiéndolo hacia la formación del Uro'gen III. La polimerización del PBG, ocurriría sobre la superficie de la enzima sin la liberación de intermediarios al medio (91).

También el laboratorio de Battle sugirió que el reordenamiento ocurre durante la polimerización del PBG muy probablemente en las primeras etapas aunque no descarta la posibilidad que sea al final (81, 90).

El grupo de Battersby, en cambio, utilizando el sistema PBG-D + URO-CoS encuentra incorporación del dipirrilmetano III en Uro'gen III en ausencia de PBG y concluye que el reordenamiento ocurre a nivel del tetrapirrol (96). Posteriormente propusieron que el hidroximetilbilano no ordenado (a, Figura 10) es el producto de la PBG-D

y el sustrato de la URO-CoS (97).

El grupo de Scott (98) halló, por estudios de RMN de ^{13}C , la existencia de un intermediario cíclico no ordenado que denominó pre-Uro'gen III (b, Figura 10) y que sería el sustrato de la URO-CoS.

Sin embargo el grupo Battersby (99) demuestra que el pre-Uro'gen no es intermediario y que tanto el hidroximetilbilano natural como el sintético son igualmente buenos sustratos de la URO-CoS libre de PBG-D. Estos autores proponen que la PBG-D une las 4 moléculas de PBG para dar un tetrapirrol lineal y la URO-CoS es la enzima que cierra el anillo y lo reordena. En ausencia de URO-CoS el producto de PBG-D, que es inestable, se cicla químicamente en forma rápida a Uro'gen I.

El hidroximetilbilano se ha probado que actúa como sustrato de la URO-CoS en mamíferos, plantas (100) y Euglena (97). Se estableció que el orden de unión de las 4 unidades de PBG a la PBG-D es el siguiente: primero se une el anillo A seguido del B, C y finalmente el D (101). La primera unidad de PBG se une covalentemente a la enzima (102, 103) posiblemente a un residuo de lisina de la enzima (104). Bajo condiciones normales ningún intermediario entre PBG e hidroximetilbilano se libera a la solución y las diferentes formas de enzima que llevan unidas cadenas pirrólicas de 1, 2 y 3 unidades de PBG pueden ser separadas cromatográficamente (105) o electroforéticamente (106).

En la Figura 11 se muestran los pasos propuestos por Battersby

para la síntesis de Uro'gen I y III a la luz de los conocimientos que se tienen hasta el presente (104).

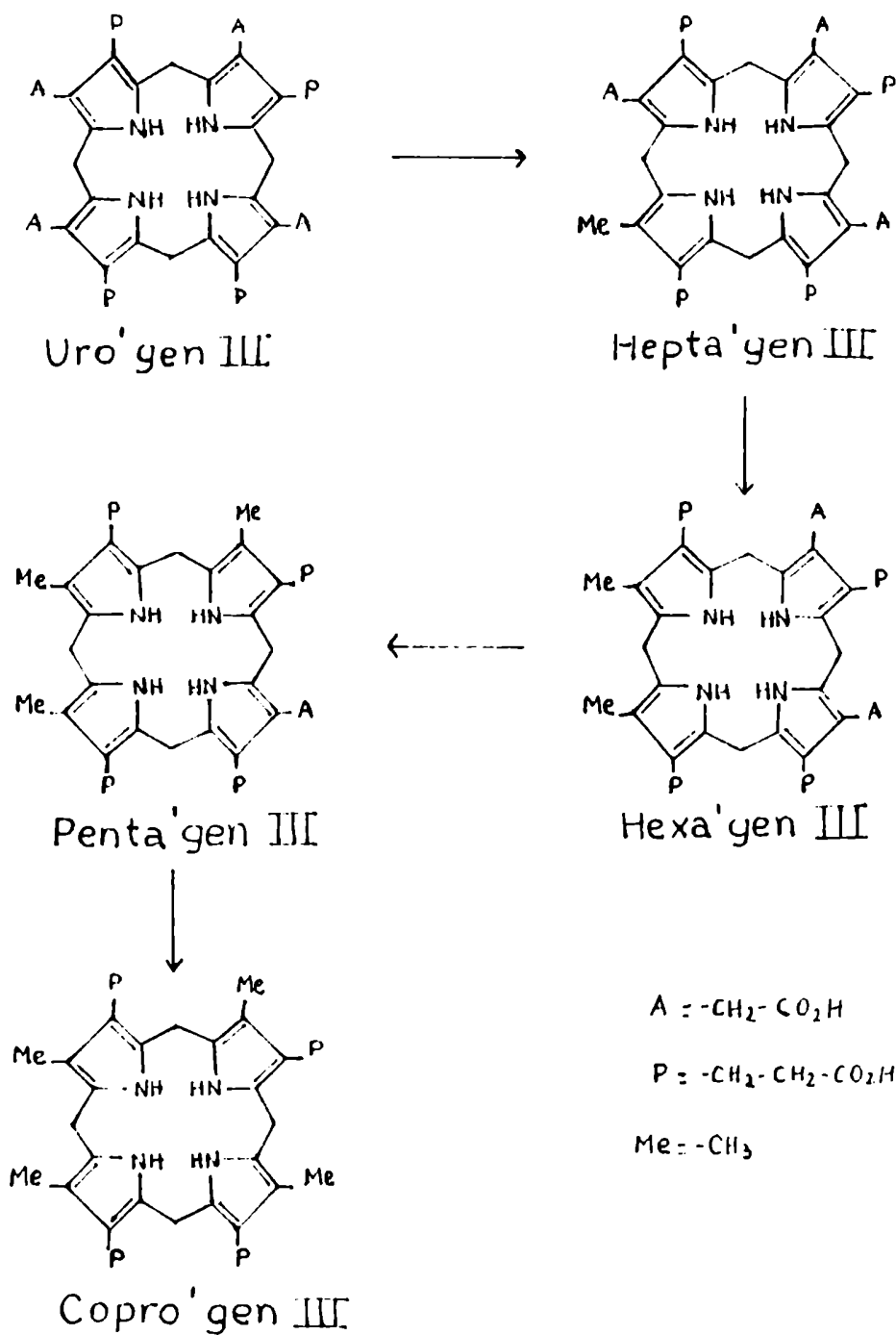
I - 4. Transformación de Uro'gen III en Copro'gen III.

La Porfirinógeno carboxilasa (PCL) es una enzima citosólica que cataliza la descarboxilación de un gran número de porfirinógenos naturales y sintéticos sustituidos con ácido acético (107, 108). Durante la biosíntesis del hemo la PCL cataliza la descarboxilación secuencial de las 4 cadenas de ácido acético del Uro'gen III (8 COOH) para dar Copro'gen III (4 COOH), con la formación de los porfirinógenos intermedios hepta, hexa y pentacarboxílicos (109 - 111). La descarboxilación del Uro'gen III comienza por la cadena de ácido acético del anillo D y continua en el sentido de las agujas del reloj por las cadenas de ácido acético de los anillos A, B y finalmente C (112) (Figura 12).

Estudios isotópicos indican que éste proceso de descarboxilación procede con retención de la configuración de los carbonos metilénicos de las 4 cadenas laterales de acetato (113).

Esta enzima ha sido purificada parcialmente de bacteria (114), reticulocitos de conejo (115), eritrocitos de aves (111, 116), bazo de ratón (117) hojas de tabaco (118), hígado de rata (108, 119-121) y eritrocitos humanos (122). Sin embargo, más recientemente ha sido purificada a homogeneidad a partir de hígado bovino (123) y de eri-

Figura 12: BIOSINTESIS DE COPRO'GEN III A PARTIR DE URO'GEN III.



trocitos humanos (124, 125) y de pollo (126).

Se ha podido establecer que una sola proteína cataliza la reacción y que tendría más de un sitio activo (111, 123 - 125).

La enzima es inhibida por reactivos de grupos sulfhidrilos (123-126) por lo que al menos un grupo tiólico estaría involucrado en el proceso de descarboxilación.

De Verneuil y colab. (125) han purificado 2.000 veces la enzima proveniente de eritrocitos humanos obteniendo una banda única por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de PM 46.000. La enzima parece ser un monómero.

Tiene un punto isoeléctrico (pI) de 4,6 que coincide con el valor hallado para la enzima de hígado bovino (123).

Los valores de pH óptimo de descarboxilación de los isómeros de tipo I de Uro'gen y Penta'gen son de 6,2 y 5,4 respectivamente, mientras que el pH óptimo para la descarboxilación de ambos isómeros de tipo III es 6,8.

A pH 6,8 los valores de K_m para Uro'gen I y III, y Pentagen I y III son 0,80; 0,35; 0,07 y 0,05 μM respectivamente. Varios autores encuentran que la velocidad de descarboxilación del Uro'gen III es mayor que la del I (115, 127), algunos encuentran que son iguales (117, 128).

La enzima de eritrocitos humanos fue fuertemente inhibida por algunos metales tales como Cu^{2+} , Hg^{2+} y Pt^{2+} , y no se afectó por Fe^{2+} , Fe^{3+} y Pb (125). Respecto del hierro se ha informado que inhibe (128) estimula (129) o no tiene efecto (130, 131) sobre la actividad de la enzima usando preparaciones crudas. La enzima de

hígado de rata es inhibida por clorofenoles (132) y por varios metabolitos del hexaclorobenceno (HCB) (133).

I - 5. Transformación de Copro'gen III en Proto'gen IX.

El Copro'gen III es transportado a la mitocondria donde sufre una descarboxilación oxidativa de los grupos propiónicos de las posiciones 2 y 4 que se transforman en vinilos obteniéndose así Proto'gen IX (Figura 13).

Esta reacción está catalizada por la enzima Coproporfirinógeno oxidasa (Copro-O) que tiene una alta especificidad por el sustrato ya que no son utilizados ni Copro'gen I ni Coproporfirina III (134).

Esta enzima fue estudiada y purificada a partir de varias fuentes como levadura (135), hígado de rata (136) y bovino (137).

La Copro-O fue purificada a homogeneidad a partir de mitocondria de hígado bovino (137). Se determinó que se trataba de un monómero de PM 71.600 que es algo inferior al informado para la enzima de hígado de rata (80.000 ± 8.000) (136).

La enzima de hígado bovino no contenía grupos prostéticos como hemo o flavina y tampoco se detectó la presencia de metales. La actividad enzimática no fue afectada por reactivos de grupos sulfhidrilos, metales o quelantes de metales. La enzima purificada fue activada de 2 a 5 veces por un extracto de fosfolípidos proveniente de mitocondria de hígado así como fosfolípidos comerciales.

Tanto el extracto de fosfolípidos como fosfatidiletanolamina produjeron un incremento de $V_{\text{máx}}$ y un decremento de K_m desde $48 \mu\text{M}$ (valor hallado para la enzima pura) hasta 25 y $18 \mu\text{M}$ respectivamente.

La Copro-O fue localizada dentro de la mitocondria en el espacio intermembrana (138, 139).

En la conversión de Copro'gen III a Proto'gen IX se descarboxila primero la cadena de ácido propiónico de la posición 2 y luego la de la 4 para dar los correspondientes grupos vinilos (140-142).

En mamíferos, aves y plantas la enzima requiere O_2 . Sin embargo los microorganismos que crecen en anaerobiosis estricta deben ser capaces de transformar Copro'gen III en Proto'gen IX utilizando un aceptor de hidrógeno distinto de Oxígeno. En realidad se informó por primera vez la existencia de una Coproporfirinógeno oxidasa anaeróbica en *Pseudomonas* (143). La bacteria fotosintética *Rhodopseudomonas spheroides* que puede vivir en aerobiosis y anaerobiosis tiene Copro-O aeróbica y anaeróbica (144).

La enzima de plantas y animales, como la aeróbica y la anaeróbica de *Rhodopseudomonas spheroides* provoca la pérdida del átomo de hidrógeno pro S de la posición β de cada cadena de ácido propiónico (144 - 147).

Yoshinaga y Sano (142) realizaron estudios con la enzima purificada de hígado bovino y propusieron que la transformación de ácido propiónico en vinilo ocurre a través de intermediarios β -

hidroxilados de ácido propiónico que se forman en las posiciones 2 y 4 sucesivamente.

I - 6. Formación de Proto. IX.

La Protoporfirinógeno oxidasa (Proto-O) cataliza la oxidación de Proto'gen IX a Proto IX (Figura 14).

Esta enzima fue parcialmente purificada y estudiada en levadura (148) e hígado de rata (149).

La Proto-O de mitocondria de hígado de rata (149) tiene un PM de 35.000 determinado por tamizaje molecular utilizando Sephadex G-200.

La enzima actúa sobre Proto'gen IX específicamente y posee un Km aparente de $11 \mu\text{M}$; su pH óptimo es de 8,6-8,7. El oxígeno es esencial para la actividad enzimática no encontrándose requerimiento de metales o cofactores.

La enzima de hígado de rata no se sintetiza en la mitocondria (150) en contraste a lo informado previamente para la enzima de levadura (151). La Proto-O está asociada a la membrana interna de la mitocondria y no parece estar expuesta a la fase acuosa más bien contenida dentro de la bicapa lipídica (152). El Proto'gen IX tiene igual acceso al sitio activo de la enzima a partir de ambos lados de la membrana interna y este proceso no parece ser dependiente de energía sino que se trataría más bien de una difusión pasiva a través de la capa lipídica de la membrana gracias a la alta lipofilidad de este sustrato.

Este hecho estaría favorecido ya que el Proto'gen sería sintetizado por la Copro-O en las proximidades de la membrana interna (139). De este modo la ubicación de la Copro-O en el espacio intermembrana sería muy importante para asegurar el acceso del sustrato de la Proto-O.

I - 7. Transformación de Proto IX en Hemo.

La enzima Ferroquelatasa (FQ) cataliza el último paso del camino biosintético del hemo, es decir la inserción de Fe^{2+} en Proto IX (Figura 15).

Esta enzima fue encontrada en microorganismos y mitocondrias provenientes de hígado, médula ósea, reticulocitos de conejo y muchos otros tejidos (153-156).

La FQ ha sido purificada recientemente de la bacteria Rhodopseudomonas spheroides (157), hígado de rata (158) y de vaca (159, 160).

La enzima de rata es un multímero de PM 240.000 formado por monómeros de PM 40.000 (158) mientras que la de Rhodopseudomonas spheroides es un monómero de PM 115.000 (157).

Existen discrepancias con respecto a la enzima de hígado bovino ya que mientras unos autores (160) encuentran un PM de 40.000 tanto por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS como por cromatografía de filtración por geles (Sephara CL

6B); otros (159) informan un PM de 42500 por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y PM 200.000 por filtración por gel en Sepharosa 6B.

La enzima purificada de hígado de rata (158) presentó los siguientes valores de K_m para los distintos sustratos: Proto IX: $28,5 \mu M$; Mesoporfirina IX: $26,7 \mu M$; Fe^{2+} con Proto IX: $33,1 \mu M$ y Fe^{2+} con Mesoporfirina IX: $37,4 \mu M$; los cuales son algo menores a los informados para la enzima de hígado bovino (159).

El pH óptimo para la reacción con las enzimas de ambas fuentes fue de 7,8 - 8,0.

Se encontró que metales como Pb, Mn, Hg, Co y Zn inhiben la actividad enzimática (158, 160 - 162) así como también los reactivos de grupos sulfhidrilos (157, 158, 161 - 163) mientras que los ácidos grasos y los fosfolípidos parecen estimularla (158 - 160).

Esta enzima es capaz de incorporar diferentes iones divalentes como Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} en diferentes porfirinas dicarboxílicas (153, 159, 164 - 166), aunque algunos autores sugieren que no se trataría de la misma enzima (167).

En todos los sistemas estudiados la FQ resultó ser una enzima unida a membrana. En bacteria se encuentra en la membrana citoplasmática (157, 168) y en eucariotes está unida a la membrana interna de la mitocondria (164).

Mientras algunos autores trabajando con la enzima cruda o solubilizada por detergentes han sugerido un mecanismo bi - bi

al azar para esta reacción (153, 166, 169); otro grupo, utilizando la enzima purificada de hígado bovino, propuso un mecanismo secuencial ordenado bi - bi en el que se uniría primero el hierro a la enzima y luego la porfirina y se liberaría el hemo antes que los 2 protones (160).

II - REGULACION DEL CAMINO BIOSINTETICO DEL HEMO.

II - A. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE ALA-S HEPATICA.

Aunque se ha informado de la existencia de distintos factores que modifican las actividades de casi todas las enzimas de este camino, el lugar primario de control se ejerce, sin lugar a dudas, a nivel del ALA-S. Esto es lógico si se considera que el ALA es el primer intermediario específico del camino y los sustratos iniciales Glicina y Succinil-CoA están disponibles en exceso. Más aún ALA-S es la enzima de velocidad limitante del camino, por lo tanto, su regulación implica el control de la velocidad total de formación de hemo en el hígado. En realidad después de la formación de ALA, la cinética de las enzimas siguientes del camino es tal que en condiciones normales la excreción de ALA, PBG y porfirinógenos o sus correspondientes porfirinas es despreciable frente a la cantidad total de hemo sintetizado.

Cuando se agrega ALA en ensayos "in vivo" o "in vitro" es rápidamente convertida por el hígado a hemo sin acumulación significativa de intermediarios. Este hecho parece oponerse a posibles efectos regulatorios importantes en pasos enzimáticos distantes de ALA-S bajo condiciones fisiológicas.

El hemo es el regulador por "feedback" negativo de ALA-S (16). Este hecho fué inicialmente encontrado en bacterias (16, 170).

Han sido propuestos 3 tipos diferentes de regulación por "feedback":

- 1) Inhibición por "feedback" de ALA-S por hemo.
- 2) Represión por "feedback" de la síntesis de ALA-S por hemo.
- 3) Inhibición por hemo de la translocación del ALA-S soluble del citosol a la mitocondria.

1) La inhibición de ALA-S por hemo fue demostrada con concentraciones de hemo entre 10^{-4} y 10^{-5} M usando preparaciones de enzima parcialmente purificadas (11, 31), pero no pudo ser demostrada en homogenato de hígado.

La K_i del hemo fue 2×10^{-5} M (11) que es 200 veces la concentración requerida para producir represión de la síntesis de la enzima. Este hecho hizo dudar de la importancia fisiológica de esta inhibición por producto final. Pero, como ALA-S y Ferroquelatasa se encuentran en la mitocondria (17, 18, 164) se podría generar una concentración local de hemo suficientemente alta para in-

hibir el ALA-S.

Sin embargo Wolfson y colab. (171) encontraron que el aumento de la producción de hemo en la mitocondria de hígado de rata no afecta la actividad de ALA-S, aún cuando la formación de hemo sea 75 veces superior a la basal que tiene lugar "in vivo".

Estos datos sugieren que la inhibición de ALA-S por hemo no sería un mecanismo fisiológico importante para la regulación de la biosíntesis hepática de hemo.

2) El control de la síntesis de enzima por represión permite una regulación de la biosíntesis más económica porque evita una formación innecesaria de la nueva proteína. De acuerdo al modelo de Jacob y Monod (172) propuesto sobre la base de estudios en bacterias, la última molécula de un camino metabólico puede reaccionar con un aporepresor para formar un represor. Este represor impide la síntesis del mRNA que codifica para algunas proteínas del camino.

En el caso particular de la síntesis de hemo este represor inhibiría la síntesis de ALA-S como lo muestra el esquema propuesto por Meyer y Schmid (173) (Figura 16).

Whiting y Granick (174) probaron que la represión de la síntesis de hemo es un mecanismo fisiológico importante. Utilizando un anticuerpo preparado contra la enzima aislada de mitocondria de hígado de embrión de pollo, mostraron que el aumento de actividad de ALA-S producido por AIA y DDC en los embriones estaba acom

pañado por cambios proporcionales en la cantidad de enzima y la hemina bloqueaba tanto el aumento en la actividad como en la cantidad de enzima sin afectar la síntesis general de proteínas. Estudios del mismo laboratorio mostraron que eran necesarias concentraciones de hemo entre 10^{-7} y 10^{-8} M para reprimir la actividad de ALA-S inducida en cultivo de hepatocitos de embrión de pollo (175).

Se ha informado que el hemo reprime la síntesis de enzima tanto a nivel de traducción: en hígado de embrión de pollo (47, 176 - 178) o de rata (179, 180) como a nivel de transcripción en estudios con polisomas aislados de hígado de embrión de pollo (20) y de ratas (34) y en cultivo de hepatocitos de embrión de pollo (181).

En trabajos recientes Yamamoto y colab. (34) encontraron que la administración intravenosa de hemina (2 mg/Kg de peso) a ratas pretratadas con AIA inhibe la síntesis de novo del mRNA de ALA-S.

Por otro lado se observó que en ratas tratadas con DDC(179) y ratas normales (180) la administración de hemina (5 mg/Kg de peso) causa una inhibición post-transcripcional. Considerando estas evidencias se puede concluir que la síntesis de ALA-S en hígado de rata es reprimida por hemo a ambos niveles: transcripcional y traduccional.

Por otro lado, Yamamoto y colab. informaron (180) que el grado de inhibición de la translocación de ALA-S de citosol a

mitocondria en hígado de rata así como el grado de inhibición de la síntesis de la enzima a nivel post-transcripcional, que se observa después de la administración intravenosa de varias dosis de hemina, muestra una buena correlación con el cambio en el grado de saturación de la triptofano pirrolasa. Esta es una hemoproteína que se ha propuesto como un marcador sensible para ensayar cambios pequeños en la concentración intracelular de hemo (182), que se designa como el "pool" regulatorio de hemo (183), en el hígado.

Tanto la translocación intracelular de ALA-S como la síntesis de la enzima a nivel post-transcripcional parecen ser inhibidas por concentraciones intracelulares de hemo menores que aquellas necesarias para alcanzar una completa saturación de la triptofano pirrolasa, sugiriendo que ambas inhibiciones contribuirían en la regulación "feedback" de la biosíntesis de hemo bajo condiciones fisiológicas (180).

Como se ha visto, la dosis de hemina necesaria para inhibir la síntesis de ALA-S en ratas pretratadas con AIA a nivel transcripcional es de 2 mg/Kg de peso (34) que es muy cercana a la dosis de hemina (1.6 mg/Kg de peso) necesaria para una máxima inhibición de la translocación de la enzima en ratas tratadas con AIA. Esto sugiere que la inhibición transcripcional de hemo también puede tener significado fisiológico.

Sudo y colab. (184) informaron que la constante de disociación del hemo de la triptofano pirrolasa de hígado de rata es

$1,3 \times 10^{-8}$ M. La variación del "pool" regulatorio de hemo dentro de este rango de concentraciones puede ser responsable de la regulación "feedback" de los niveles de ALA-S.

Para clarificar el mecanismo de control traduccional de la síntesis de ALA-S por hemo, en un trabajo más reciente, Yamamoto y colab. (36) observaron que la hemina inhibe específicamente la síntesis de ALA-S a nivel de la elongación de la cadena del péptido. Este sería el primer ejemplo de control traduccional de una enzima de velocidad limitante por el producto final del camino.

Estos resultados no descartan un efecto de hemina en la iniciación o en la transcripción. De hecho estos mismos autores encuentran efectos a nivel de transcripción (34) como ya se ha visto. Por lo tanto, el hemo actuaría a nivel traduccional y transcripcional.

3) El grupo de Kikuchi y colab. (185) fue el primero en postular que la hemina bloquea la translocación de ALA-S a la mitocondria.

En sus estudios con ratas (48) demostraron que la inyección de hemina a animales tratados con AIA provoca la acumulación de ALA-S enzimáticamente activa en el citosol e inhibe la translocación de la enzima a la mitodondria desde su lugar de síntesis en el citoplasma.

En un trabajo posterior Ades (186) probó que la hemina bloquea el procesamiento del precursor de ALA-S en cultivo de hepatocitos de embrión de pollo pretratados con AIA ya que en presen

cia de hemina sólo se acumula pre-ALA-S, pero no había evidencias de que hemina bloqueara la transferencia del precursor a la mitocondria.

Esto último fue demostrado más tarde por Srivastava y colab. (22) quienes encontraron que si se trataba con hemina embriones de pollo pretratados con AIA y DDC, luego se hacía un pulso de marcación con ^{35}S -metionina, después del cual se obtenía la fracción mitocondrial y citosólica del hígado y se inmunoprecipitaba con anticuerpos contra ALA-S, el nivel de pre-ALA-S en el soluble aumentaba considerablemente y no se detectaba ALA-S recién sintetizada en la mitocondria. En los controles sin hemina, en cambio, se detectaba ALA-S madura en la mitocondria y pre-ALA-S en el citosol. Es decir que la hemina impide la transferencia de la enzima recién sintetizada a la mitocondria. Cabe señalar que la hemina no tiene ningún efecto sobre la síntesis de proteínas totales ni en mitocondria ni en citosol. Por otro lado para evaluar si este efecto de hemina resulta de una disminución general de la función de transporte de la membrana mitocondrial, se estudió el efecto de hemina sobre el transporte a la mitocondria de una enzima no relacionada, la piruvato carboxilasa, una enzima de la matriz mitocondrial que también se sintetiza en el citosol como una proteína precursora de mayor PM.

La hemina no tiene ningún efecto sobre esta translocación lo que elimina un efecto tóxico general o no específico de hemina en la incorporación de proteínas en mitocondria y sugiere que he-

mina afecta específicamente la translocación de ALA-S a la mitocondria.

Confirmando todos estos resultados Hayashi y colab. (187) encontraron que cuando se sintetiza el precursor de ALA-S de hígado de pollo en un sistema de traducción libre de células de lisado de reticulocitos y luego se lo incuba con mitocondrias de hígado homólogo, el precursor se incorpora a su sitio en la mitocondria y es convertido a enzima madura por un procesamiento proteolítico durante su transferencia a la mitocondria. En este sistema experimental "in vitro" el transporte y el procesamiento de ALA-S es inhibido por hemina.

Esto confirma los resultados ya citados (48) obtenidos por este mismo grupo "in vivo", según los cuales la inhibición de la translocación de ALA-S por hemo puede ser uno de los mecanismos regulatorios de la biosíntesis del hemo en células de hígado, es decir, que el producto final del camino biosintético bloquearía la translocación de la enzima de velocidad limitante del camino a modo de control "feedback".

Una posible interpretación de este efecto de hemina sería que la hemina se une o interactúa específicamente con el precursor de ALA-S de modo de interferir su interacción con el componente (o los componentes) de la maquinaria de transporte.

Estos mismos autores (36) han probado que hemina inhibe la síntesis de ALA-S dirigida por polisomas de hígado en un sistema de traducción de lisado de reticulocitos libre de células y los

datos obtenidos sugieren que puede ser importante en esta inhibición una interacción específica de hemina con las cadenas de péptidos nacientes de la enzima.

II - B. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE ALA-S EN TEJIDOS DISTIN- TOS DEL HEPATICO.

En el hígado se han encontrado todos los mecanismos de regulación de ALA-S por hemo anteriormente descriptos.

Sin embargo, contrariamente a estos resultados hallados en tejido hepático, la enzima presente en tejido eritroideo no responde a drogas que normalmente producen aumento de actividad de la enzima hepática, más aún la enzima no se acumula significativamente en el citoplasma de células eritroides cuando se las trata con hemina y tampoco parece ser reprimida por hemo (188-193). Estos hechos sugieren que la enzima eritroidea tendrá mecanismos de regulación distintos de los de la hepática.

Apoyando esta idea se encontró que el ALA-S hepática y eritroidea difieren en tamaño, a nivel de la proteína madura y de la preenzima.

Por otro lado Bishop y colab. (192) sugieren la existencia de isoenzimas en base a las diferencias halladas en las propiedades cinéticas y de unión de ligandos entre las enzimas aisladas de tejido eritrocitario y no eritrocitario.

En 1985 Yamamoto y colab. (194) aislaron una secuencia de DNA que codifica al ALA-S eritroidea. El mRNA que codifica esta isoenzima particular tiene una longitud de 2.000 nucleótidos aproximadamente y parece expresarse en células eritroides únicamente. Estos autores sugieren que esta enzima sería codificada por una familia de multigenes cuyos componentes serían responsables de las diferentes características y regulación de esta actividad enzimática en los distintos tejidos.

Estas diferencias entre ALA-S hepática y eritroidea podrían ser claves para interpretar los distintos rasgos de porfirias hepáticas y eritropoyéticas.

III - PORFIRIAS EXPERIMENTALES.

Las porfirias son alteraciones generalmente hereditarias en el camino biosintético del hemo que se caracterizan por un aumento en la excreción y acumulación de porfirinas y/o precursores (195, 196).

Estas se dividen en 2 grandes grupos: porfirias hepáticas y eritropoyéticas según sea en el hígado o en el sistema eritropoyético la localización principal del disturbio.

Actualmente se sabe que numerosas drogas desencadenan ataques de porfiria en personas con la enfermedad latente y también pueden empeorar el curso de la enfermedad en pacientes con porfiria declarada.

Mientras que pequeñas dosis de estas drogas pueden inducir un ataque de porfiria en pacientes que llevan el rasgo hereditario, dosis mayores provocan alteraciones en el metabolismo de las porfirinas en sujetos y animales normales.

Estas drogas se conocen como Drogas Porfirinogénicas.

En los últimos años se encontró que varios compuestos no relacionados químicamente producen desórdenes en animales de laboratorio o en cultivo primario de hepatocitos de embrión de pollo que reproducen las alteraciones bioquímicas de diferentes tipos de porfirias humanas.

Estos desórdenes del metabolismo de las porfirinas se conocen como: Porfirias Experimentales (197).

A partir del estudio de las porfirias experimentales se ha obtenido una información valiosa que ha permitido comprender mejor las porfirias humanas y la inusual sensibilidad a ciertas drogas por parte de pacientes con esta enfermedad así como también la regulación de la biosíntesis del hemo.

Entre las diversas drogas capaces de producir Porfiria Experimental algunas de las más estudiadas son: alilisopropilacetamida (AIA), 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) y Hexaclorobenceno (HCB).

III - 1. Efecto del AIA sobre la biosíntesis del hemo.

La administración de AIA a animales de experimentación pro

duce un aumento de la actividad de ALA-S y una marcada acumulación de los precursores ALA y PBG. Esto reproduce el cuadro bioquímico de la porfiria hepática humana de tipo agudo intermitente (197,198).

Después de la administración de esta droga se encontró aumento de la actividad de ALA-S no sólo en mitocondrias sino también en citosol en hígado de rata (25, 30, 199) y pollo (32).

En contraste con lo encontrado en mamíferos y pollos adultos, en el hígado de embrión de pollo, ya sea en cultivo o "in ovo", no se ha detectado actividad en el citosol o se ha detectado una actividad extremadamente pequeña luego de la administración de AIA(27, 47).

Sin embargo se ha determinado la existencia del precursor de ALA-S en el citosol de hígado de embrión de pollo (23), pero no se sabe si los niveles son muy bajos para poder detectar actividad o es inactivo. Se necesitan más estudios para saber si la forma que se acumula en el citosol de pollo adulto es igual a la detectada en el de embrión de pollo.

Se ha estudiado el efecto sobre el aumento de ALA-S por AIA de inhibidores de la síntesis de proteínas a nivel de traducción como la Cicloheximida (CH) y a nivel de transcripción como la Actinomicina D (ActD).

Se ha visto que trabajando con hígados de embrión de pollo, ya sea cultivo de órgano (47) o de hepatocitos (177), tanto la CH como la ActD al ser administradas con AIA simultáneamente bloquean el aumento de ALA-S. Cuando se adiciona CH luego de producido

el aumento de actividad por la droga, la vida media de la enzima resulta ser en un caso de 2 horas (47) y en el otro de 3,8 horas (177).

También se ha informado en cultivo de hepatocitos una vida media de 3 horas (176). En mitocondrias de hígado de pollo adulto (32) y de rata (48) la vida media es de aproximadamente 30 minutos y la enzima parece degradarse principalmente, o quizás exclusivamente, en la mitocondria (32).

Si en cambio se agrega ActD una vez incrementada la actividad se ve que esta se mantiene (47) o hay un pequeño incremento durante 2 ó 3 horas (177) y luego comienza a caer.

Aunque Sassa y Granick (176) propusieron que el AIA actúa primariamente a nivel de traducción, posteriormente Tyrrel y Marks (178) observaron que cuando se tratan cultivos de hepatocitos de embrión de pollo con la droga en presencia de CH y luego las células son lavadas y reincubadas en medio de cultivo nuevo sin la droga, la actividad enzimática se incrementa en forma rápida, inmediatamente después del cambio de medio, lo que muestra que el AIA estimula la síntesis del mRNA específico de ALA-S. Posteriormente otros autores también coincidieron con un efecto de la droga a nivel de transcripción (20, 47).

Se ha informado que la hemina inhibe el aumento de ALA-S producido por AIA a nivel de transcripción (20, 34, 181), traducción (47, 177, 178) y translocación de citosol a mitocondria (48,

186).

Una parte del hemo una vez sintetizado se incorpora a las hemoproteínas. Entre ellas el citocromo P-450 microsomal es la más importante cuantitativamente en ratas. Su renovación parece consumir al menos el 50% del hemo producido en el hígado (134).

Se encontró que esta droga causa una pérdida rápida del contenido de citocromo P-450 seguida de un incremento gradual de modo que se superan las concentraciones iniciales (200). La disminución inicial de citocromo P-450 va acompañada de un decremento del contenido de hemo microsomal y acumulación de un pigmento verde así como también de ALA-S (200-202).

Este pigmento verde consiste en una porfirina anormal que se origina como consecuencia de un proceso destructivo en el cual el AIA, que actúa como un sustrato suicida, alquila al grupo prostético del citocromo P-450 inactivándolo (203, 204).

Se ha sugerido que la destrucción del hemo del citocromo P-450 microsomal hepático es el mecanismo primario de inducción de ALA-S por varias drogas porfirinogénicas (205).

En cuanto al aumento de citocromo P-450 provocado por AIA (200, 206) resultados recientes sugieren que AIA y otras dos drogas porfirinogénicas, DDC y Fenobarbital (FB), todas ellas estructuralmente distintas, causan aumento de los niveles del mRNA del mismo citocromo P-450 (207) pues se conoce la existencia de varios citocromos P-450. Estos últimos poseen diferentes movilida

des electroforéticas y diferente especificidad por sustrato (208-211) y pueden dirigir el metabolismo de algún sustrato a diferentes productos (212 - 214).

El análisis de estos datos es de particular interés para interpretar el mecanismo molecular por el cual estas drogas precipitan ataques de porfirias hepáticas.

III - 2. Efecto del DDC sobre la biosíntesis del hemo.

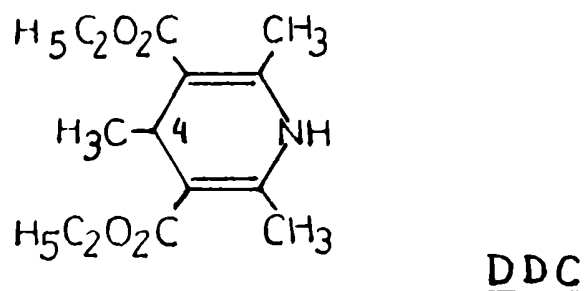
Ya en 1959 Solomon y Figge (215) describieron un tipo de porfiria experimental en ratones y cobayos causada por la administración de DDC. Esta se caracterizaba por la producción excesiva de Proto, que se acumulaba en el hígado y se excretaba en las heces. O sea que este disturbio bioquímico se asemejaba a un tipo de porfiria hepática: la porfiria variegata humana (216).

El DDC que tiene capacidad porfirinogénica en una variedad de especies animales (217) ha servido como una herramienta valiosa en el estudio del control de la biosíntesis del hemo. Esta droga reduce la actividad hepática de ferroquelatasa cuando se administra a roedores (218, 219) o embriones de pollo (206, 220).

El mecanismo por el cual se produce esta disminución de actividad fue dilucidado en años recientes. El DDC, al ser administrado a roedores provoca la acumulación en el hígado de un pigmento verde (221, 222) identificado como N-metil-protoporfirina (221-

223) que actúa como un potente inhibidor de ferroquelatasa (221, 222, 224).

El grupo metilo de la N-metil-protoporfirina proviene del grupo alquilo de la posición 4 de la molécula de DDC cuya estructura aparece a continuación (225, 226).



Debido a la distribución asimétrica en la Proto de los grupos vinilo y ácido propiónico sustituyentes existen 4 isómeros estructurales posibles de N-metil-protoporfirina monosustituída, según cual sea el anillo pirrólico alquilado. Se encontró que después del tratamiento con DDC se forma una mezcla de los 4 isómeros estructurales (226, 227).

Quedaría por determinar de dónde proviene la Proto IX que forma la N-metil-protoporfirina. Se observó que el DDC disminuye los niveles de citocromo P450 "in vivo" (228) y recientemente se demostró que ésto se debe a una destrucción del citocromo P450 preexistente y que el DDC es un sustrato suicida de dicho citocro

mo. Es decir que la fuente de la Proto IX de la N-metil-protoporfirina es el hemo del citocromo P450 (226, 229-231).

De Matteis y colab. (219) encuentran que la administración de DDC a ratas causa inicialmente una disminución del citocromo P450 en el hígado y luego de 24 horas retorna a valores normales. Por otro lado Rifkind (206) informa que bajas dosis de DDC no afectan las concentraciones de citocromo P450 y dosis mayores incrementan el contenido de citocromo P450 de hígado de embrión de pollo luego de 24 horas. En concordancia con estos resultados y como ya se ha señalado, se ha encontrado aumento del mRNA del apocitocromo P450 en embriones de pollo tratados durante 16 horas con DDC, AIA o FB (207).

El DDC también produce aumento de la actividad hepática de ALA-S en hígado de mamíferos y aves (20, 219). En este caso, al igual que con AIA, se encuentra acumulación en citosol de cobayo (31) y ratones (232, 233) pero no de embriones de pollo (20, 47).

Tomita y colab. (47) trabajando con cultivos de hígado de embrión de pollo encontraron que el aumento de ALA-S provocado por esta droga es completamente inhibido por Actinomicina D o Cicloheximida. Cuando la Actinomicina D se agrega al medio de cultivo una vez inducida la enzima con DDC, la actividad de ALA-S recién comienza a decrecer luego de 2 horas por lo que sugieren que el mRNA de ALA-S tendría una vida de 2 a 3 horas. En cambio, si agregan Cicloheximida una vez inducida la enzima, la actividad cae rápidamente encontrándose una vida media para ALA-S de 4 a 5

horas mientras que para AIA, los mismos autores determinaron una vida media de 2 horas.

La mayor vida media observada con DDC no se debería a esta bilización de la enzima por el DDC sino que se trataría de una menor velocidad de recambio (47).

El DDC induce la actividad de ALA-S actuando a nivel de transcripción es decir incrementando los niveles del mRNA específico (20, 47, 176, 178).

La hemina inhibe la síntesis de ALA-S y su translocación a la mitocondria en animales tratados con DDC (47, 48, 179, 232).

III - 3. Efecto del HCB sobre la biosíntesis del hemo.

HCB es un típico ejemplo de un compuesto utilizado para producir porfiria experimental que se desarrolló en base a observaciones clínicas.

En 1956 se produjeron varios cientos de casos de porfiria del tipo cutánea tarda humana (PCT) en el sur de Turquía (234, 235) como consecuencia de la ingestión crónica de trigo que había sido tratado con el fungicida HCB. La capacidad porfirinogénica del HCB fue definitivamente demostrada por Ockner y Schmid (236) quienes provocaron porfiria hepática experimental en ratas tratadas crónicamente con una dieta que contenía HCB.

El HCB produce un importante decremento de la PCL y un con

secuente aumento del ALA-S, lo que lleva a una gran acumulación y excreción de porfirinas altamente carboxiladas (237-241).

Estudios cinéticos con HCB demostraron que PCL es la enzima clave para la acción del fungicida sobre el camino biosintético del hemo, es decir aquélla sobre la que actúa primariamente (241). Su fuerte decremento podría deberse a la presencia de un inhibidor termoestable o parcialmente termoestable en las preparaciones porfíricas de animales tratados con HCB (132). Esta disminución no parece deberse a una menor síntesis de PCL (242).

El hierro parece tener un rol importante en el desarrollo de esta porfiria. La siderosis hepática es un rasgo comunmente asociado con la PCT (243). Además la flebotomía produce remisión de la enfermedad (244) mientras que la sobrecarga de hierro favorece la manifestación del cuadro de porfiria (245).

La porfiria experimental inducida por hidrocarburos policlorados también parece estar relacionada con la siderosis hepática ya que se encontró que el contenido de hierro es incrementado por el tratamiento de ratas con HCB (131, 246, 247), bifenilos policlorados (248) y 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (249).

Además se observó que la sobrecarga de hierro acelera y exacerba la porfiria inducida por HCB (239, 250) y que el decremento de PCL que produce esta droga es mayor cuando los animales se ponen sideróticos previamente (251).

Podría ser entonces el hierro, que se encuentra incrementa

do en los hígados porfíricos, el inhibidor de PCL. Sin embargo varias observaciones sugieren que el hierro "per se" no es un inhibidor de la enzima (131, 250, 251).

Por otro lado aunque varios metabolitos del HCB no inducen porfiria (252) evidencias indirectas a partir de estudios de pretratamiento con fenobarbital (un inductor del sistema microsomal hepático metabolizante de drogas) sugieren que la acción del HCB puede estar mediada por un epóxido, radical u otro metabolito reactivo de vida corta (241). El hierro podría ser necesario en algún paso de la metabolización del HCB para favorecer la formación de dicho metabolito (253) que luego provocaría la disminución de PCL.

Este punto de vista podría ser avalado por el hecho que las ratas de la cepa Agus que tienen un contenido de hierro hepático mayor que las Wistar y que son más susceptibles a la acción porfirinogénica del HCB (254), tienen una mayor concentración de sus metabolitos en el hígado (255). Sin embargo también se informó que aunque la sobrecarga de hierro incrementa la suceptibilidad para adquirir porfiria de ciertas cepas de ratones este hecho no se correlaciona con la inducibilidad de la arilhidrocarburohidroxilasa (250). Se requieren más estudios para dilucidar definitivamente el mecanismo de acción del HCB.

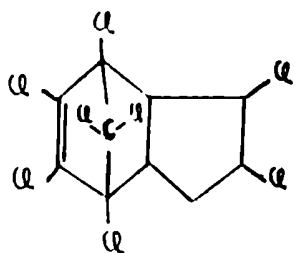
IV - LINDANO, CLORDANO, ENDO-
SULFAN, PARATION Y MALA-
TION.

Como ya se ha visto, se ha estudiado el efecto sobre el camino biosintético del hemo de numerosas drogas com: AIA, DDC, gri seofulvina (198, 256) y una serie de compuestos clorados como: HCB, pentaclorofenol (257, 258), bifenilos policlorados (259, 260), clorodioxinas (249, 261, 262), aldrin endrin (263) heptaclor (264).

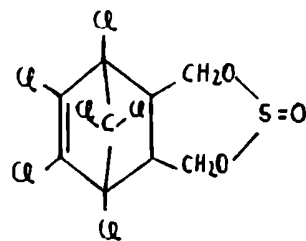
El Lindano (γ hexaclorociclohexano), cuya estructura se muestra en la Figura 17, es otro compuesto clorado, químicamente relacionado con el HCB y a su vez un insecticida de uso muy difundido, pese a lo cual ha sido poco estudiado en cuanto a su capacidad porfirinogénica. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que es porfirinogénico en embriones de pollo (264). Por lo tanto hay informes sobre la acción de algunos plaguicidas clorados sobre este camino pero se sabe poco o nada sobre la acción de otros compuestos clorados como Clordano y Endosulfán, y de compuestos fosforados de uso muy difundido como malatión y paratión. Las estructuras químicas de estos cuatro compuestos aparecen en la Figura 17.

El Clordano es principalmente usado para proteger frutas y vegetales de los insectos del suelo pero es también muy usado para el control de hormigas y termitas, y en los hogares contra moscas, mosquitos y cucarachas (265).

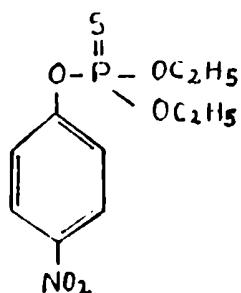
Figura 17: ESTRUCTURAS DEL: CLORDANO, ENDOSULFAN, PARATION,
MALATION Y LINDANO.



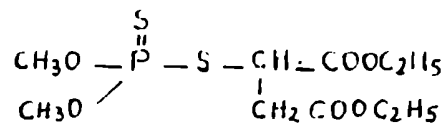
Clordano



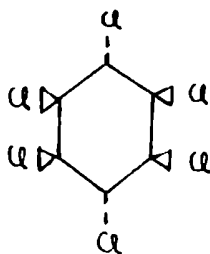
Endosulfan



Paratión



Malatión



Lindano

El Endosulfán es efectivo para muchas plagas para las cuales se usaba anteriormente DDT (p,p'-diclorodifeniltricloroetano) pero encuentra su mayor aplicación contra plagas de algodón, arroz y cereales. Por su eficacia contra la larva de los lepidópteros y su vida residual relativamente corta encuentra amplia aplicación para tratar pastura y cosecha de forraje; el uso de Endosulfán con este propósito no produce residuos en carne, leche o huevos (265).

En cuanto a los insecticidas organofosforados el Paratión (266) es uno de los más conocidos del grupo y pese a su relativamente alta toxicidad es muy usado en la agricultura como insecticida de amplio espectro. El Paratión es retenido en la superficie de plantas y frutas y puede permanecer el tóxico por días. Por su alta toxicidad no se usa en el hogar.

El Malatión (266) es el menos tóxico del grupo, también es considerado un insecticida de amplio espectro y se lo utiliza en frutas, vegetales y plantas ornamentales.

Estos plaguicidas fosforados inhiben la enzima Acetilcolinesterasa con la consecuente acumulación de Acetilcolina que actúa sobre el Sistema Nervioso Central y Autónomo (266, 267).

Según un trabajo de Bryan Myher (268) en el que se estudia la influencia de varios plaguicidas sobre la incorporación de Uridina tritiada a RNA y aminoácidos marcados con ^{14}C a proteínas en células Hela; el paratión inhibe la incorporación de aminoácidos a proteínas mientras que tanto Clordano como Malatión inhiben ambos procesos.

Pese a este y a algunos otros informes referentes a la acción de los mencionados plaguicidas a nivel bioquímico prácticamente no hay informes en la literatura con respecto a su influencia sobre la biosíntesis de porfirinas y hemo.

El embrión de pollo es un sistema experimental útil para estudiar el efecto de distintas drogas sobre el metabolismo de porfirinas yasea trabajando "in vitro" con cultivo de hepatocitos (43, 45) o "in vivo" con el embrión de pollo entero (269, 270).

En un trabajo muy reciente Bonkowsky y colab. (271) realizaron estudios comparativos sobre la transformación de ALA en Hemo por homogenato de hígado humano, de rata y de embrión de pollo.

Estos autores encontraron que como modelo experimental para el estudio del metabolismo del hemo, el hígado de embrión de pollo se asemeja más al humano que el de rata. Si bien no es el modelo ideal porque la enzima de velocidad limitante en la síntesis de Hemo a partir de ALA en embrión de pollo es la Ferroquelatasa más que la PBG-Deaminasa como ocurre en el hígado humano y de rata(272). Sin embargo las máximas velocidades de transformación de ALA en Hemo por homogenatos de hígado humano y de embrión de Pollo son aproximadamente iguales (33 y 26 nmoles de equivalentes de ALA/hora/ gramo de hígado respectivamente) porque bajo las condiciones experimentales empleadas la actividad de PBG-Deaminasa de hígado humano es aproximadamente igual a la de Ferroquelatasa de hígado de embrión de pollo (271, 272).

OBJETIVOS.

En base a lo ya expuesto en la Introducción, especialmente en la Sección IV, resultó interesante estudiar el efecto de: Clordano, Endosulfán, Paratión y Malatión sobre el camino metabólico del hemo en embriones de pollo.

Con dicho fin se estudió:

1) El efecto de estos plaguicidas sobre el contenido de porfirinas en el hígado.

2) La acción de los 4 plaguicidas sobre la actividad hepática de ALA-S.

3) El efecto de la administración conjunta de estos plaguicidas con Fenobarbital (FB), Clorhidrato de 2,2-dietil-aminoetil-2,2-difenil-valerato (SKF 525A) ó DDC sobre el contenido hepático de porfirinas.

El FB estimula el metabolismo de drogas que tienen lugar en los microsomas de las células hepáticas y por lo tanto, si la acumulación de porfirinas debida a los plaguicidas se incrementa en presencia de FB, el efecto observado podría ser atribuido a un metabolito.

El SKF 525A es un inhibidor del metabolismo de drogas y como tal ha sido utilizado por Taub, Krupa y Marks (273) en conjunción con drogas porfirinogénicas en embriones de pollo, pollos y ratas.

Su uso permitirá evidenciar la capacidad porfirinogénica de aquellas drogas que actúan "per se" y cuya acción puede no detectarse a causa de una rápida metabolización.

El DDC, como ya se ha visto, es un inhibidor de la actividad de Ferroquelatasa, enzima que cataliza la formación de hemo.

El aumento en la formación de intermediarios de porfirinas en respuesta a drogas puede estar balanceado por un incremento en la síntesis de hemo y hemoproteínas como el citocromo P-450 y en este caso no habría acumulación de Proto. Si esto ocurriera, al inyectar la droga en forma conjunta con el DDC se puede visualizar el incremento de Proto al bloquearse la transformación a hemo y hemoproteínas.

Anderson (274) propone un método sensible y conveniente para analizar la capacidad inductora del camino biosintético del hemo de ciertas drogas que provocan aumento de actividad de ALA-S y/o aumento de citocromo P-450 y no producen acumulación significativa de porfirinas. Este método consiste en la aplicación de una pequeña dosis de DDC (0,25 mg) junto con la droga en estudio.

Por otro lado se quiso evaluar la capacidad porifirnogénica del Lindano en mamíferos dado el antecedente en pollos anteriormente citado.

Para ello se estudió en ratas el efecto de esta droga sobre:

- 1) La excreción urinaria de ALA, PBG y porfirinas en orina.
- 2) La excreción fecal de Copro y Proto.
- 3) La actividad de ALA-S hepática.
- 4) La actividad de PCL hepática.

Por último, debido a que se encontró un importante aumento de la actividad de ALA-S en los embriones tratados con Malatión se decidió estudiar:

- 1) La cinética de este aumento, es decir, la actividad de ALA-S en función de las horas de tratamiento de los embriones con esta droga.
- 2) El efecto de inhibidores de la síntesis proteica a nivel de traducción (Cicloheximida) y de transcripción (Actinomicina D).
- 3) El efecto de hemina, regulador fisiológico de este camino biosintético.
- 4) El efecto de FB inductor del sistema metabolizante de drogas.
- 5) El efecto de la droga "per se" sobre la actividad hepática de la enzima normal.
- 6) La distribución subcelular de la enzima.
- 7) También el efecto del Malatión sobre la actividad de la última enzima del camino biosintético del hemo: la Ferroquelatasa.

MATERIALES Y METODOS

M A T E R I A L E S .

Sustratos.

Glicina: Sigma

URO III: Porphyrin Products.

Mesoporfirina IX: Porphyrin Products.

Coenzima A: Sigma.

Succinato de sodio: Sigma.

Solventes.

Acetato de etilo: p.a. Douglas.

Acido acético glacial: p.a. Douglas.

Acido perclórico: p.a. Mallinckrodt.

DMSO: p.a. Sigma.

Cloroformo: Se empleó C. Erba F.U. para realizar las esterificaciones de las porfirinas libres y C. Erba R.P. para eluir las cromatografías.

Metanol: C. Erba F.U.

Kerosene: incoloro, se utilizó para las cromatografías la fracción que destila entre 190º - 240ºC. Se obtuvo a partir del kerosene comercial. Este fue lavado varias veces con agua, secado sobre CaCl_2 durante 48 horas y finalmente destilado con columna rectificadora. Se hizo una primera destilación entre 180º y 250ºC, es-

ta fracción se volvió a destilar recogiendo el destilado correspondiente al rango entre 190°C y 240°C.

Dioxano: Lowens para cromatografía.

Eter: p.a. Rhodia.

Plaguicidas.

El clordano, malatión y paratión fueron cedidos gentilmente por Chemotecnica Syntial S.A. Buenos Aires, Argentina.

El clordano y el lindano fueron una cortesía del Dr. Crespo de Compañía Química S.A., Buenos Aires, Argentina.

El grado de los plaguicidas fue técnico. La pureza expresada como% (p/p) es: paratión 97%, malatión 96%, endosulfan 94% y lindano 99.9%. El clordano contiene 65% de cloro en peso.

De todas las drogas empleadas el malatión fue la más utilizada y la única cuyo uso se extendió desde el comienzo hasta la finalización del presente trabajo experimental. Como se sabe que esta droga puede descomponerse durante el almacenamiento (275) se quisieron evaluar estas posibles alteraciones. Con dicho fin se hicieron a lo largo del período de trabajo cromatografías gaseosas de la droga. De este modo se pudieron comparar muestras que habían sido recién recibidas con muestras recibidas con bastante anterioridad.

Estas cromatografías pudieron realizarse gracias a una gentileza de la Cátedra de Toxicología y Química Legal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la U.B.A.

Se utilizó un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5840 A.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

Columna: 5% OV-101 sobre Chromosorb WAWIDMCS, 80-100 mesh. Dimensiones de la columna: 1,5 m de longitud y 2 mm de diámetro interno. Temperatura de la columna: 200°C. Detector de ionización de llama: Temperatura: 260°C. Alimentación de la llama: flujo de hidrógeno: 50 ml/min; flujo de aire: 300 ml/min.

Temperatura de inyección: 220°C.

Gas portador: N₂ (40 ml/min).

Se muestran los cromatogramas obtenidos con una muestra recién recibida, una muestra que había sido recibida unos 2 años antes y un patrón de malatión. Se utilizó como patrón de malatión una muestra gentilmente cedida por el Dr. Edgardo Wood perteneciente al Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN), CITEFA-CONICET.

En todos los casos se inyectaron 2 µl de soluciones 2% en hexano. Como puede verse en la Tabla I los cromatogramas obtenidos en los 3 casos son similares y, en particular, el obtenido con la muestra vieja (de aproximadamente 2 años de antigüedad) es similar al de la muestra recién recibida.

Por otro lado, cabe señalar que, a los fines del presente estudio, no se encontró una respuesta diferente al utilizar drogas de distinta antigüedad ni en cuanto a las mediciones que atañen al camino biosintético del hemo, ni en cuanto a la mortalidad de los animales tratados.

Tabla 1: CROMATOGRAFIA GASEOSA DE MALATION.

| P A T R O N | | M U E S T R A V I E J A | | M U E S T R A N U E V A | |
|------------------------------|----------|------------------------------|----------|------------------------------|----------|
| Tiempo de retención (min) | Area (%) | Tiempo de retención (min) | Area (%) | Tiempo de retención (min) | Area (%) |
| 0.81 | 0.155 | 0.80 | 0.626 | 0.79 | 0.75 |
| 1.48 | 0.103 | 1.47 | 0.013 | | |
| 3.32 | 1.476 | 3.35 | 0.154 | 3.39 | 0.112 |
| 4.21 | 98.142 | 4.26 | 99.207 | 4.28 | 99.133 |
| 8.29 | 0.041 | | | | |
| 18.09 | 0.083 | | | | |

Por lo tanto, la droga podía ser empleada varios meses después de recibida.

Otras drogas.

El fenobarbital fue una gentileza del Dr. Méndez de Bayer Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina.

El SKF 525 A se obtuvo de Smith, Kline and French International Co. Philadelphia P.A., por gentileza del Dr. Prieto de SKF Argentina.

El DDC fue adquirido a Aldrich Chemical Company Inc.

La actinomicina D y la cicloheximida fueron compradas a Sigma.

La resina Dowex A.G.1X₈, mesh 200-400, forma cloruro ó acetato ; la resina Dowex A.G.50-X₈, mesh 200-400, forma ión hidrógeno y el Sephadex G-25 provienen de Sigma.

Otros materiales empleados.

Sondas para drogado de ratas: Franklin Nelaton, 11F_R

Jeringas de 0.5 ml para inyectar los embriones de pollo.

Aguja descartable estéril 22 GX 1 1/2

Animales.

En los estudios con malatión, paratión, clordano y endosulfan se utilizaron embriones de pollo de la raza New Hampshire de

17-19 días.

En los estudios con lindano se emplearon ratas macho Wistar de aproximadamente 250 g de peso.

M E T O D O S .

I - T R A B A J O C O N E M B R I O N E S .

I - 1 . T r a t a m i e n t o d e l o s a n i m a l e s

Se trabajó con embriones de pollo de 17 a 19 días de la raza New Hampshire.

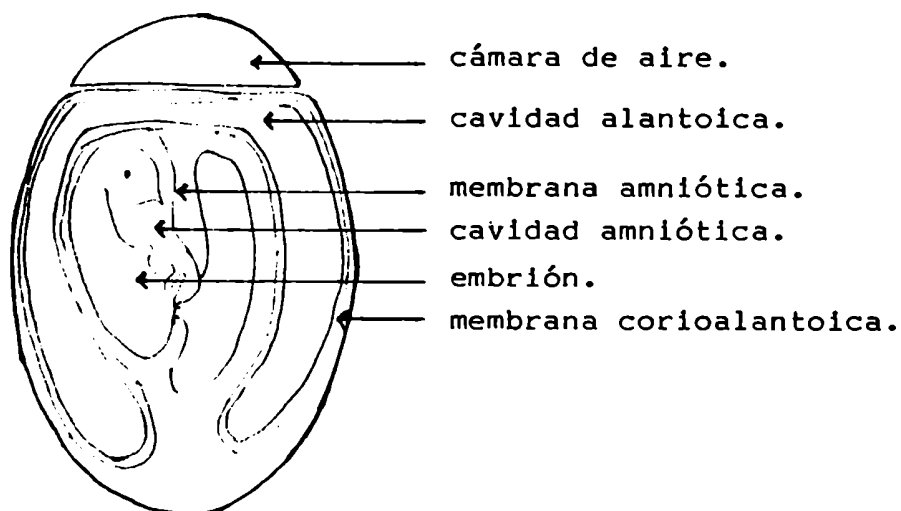
Con el fin de inyectarlos se miraron al ovoscopio para marcar con lápiz la cámara de aire. Luego se pasó un algodón con alcohol por la zona marcada y con un punzón se hizo un pequeño agujero en la cáscara del huevo por encima de la cámara de aire (ver el esquema del embrión que aparece al final de esta sección), que luego fue ampliado con una tijera a un círculo de aproximadamente 1 cm de diámetro. Con una pipeta Pasteur estéril se colocaron 2 ó 3 gotas de solución fisiológica también estéril para transparentar la membrana corioalantoica.

Las drogas se inyectaron en el líquido que rodea al embrión. Clordano, endosulfan, paratión y malatión se inyectaron disueltos en 0.2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), en las dosis indicadas en cada caso.

En los pretratamientos con FB (5 mg) , SKF 525 A (0.25 mg) ó cicloheximida (100 μ g) estas drogas se inyectaron disueltas en 0.2 ml de solución fisiológica estéril. Después de 1 hora de incubación a 38°C con estos compuestos, se inyectaron los plaguicidas en estudio.

El DDC (0,25 mg), la actinomicina D (300 μ g) y la hemina (3 y 5 mg) se inyectaron disueltas en 0.2 ml de DMSO simultaneamente con los plaguicidas.

Una vez inyectados los embriones, el orificio de la cáscara del huevo se selló con cinta adhesiva y se incubaron los embriones a 37 - 38°C en cámara húmeda (incubadora) durante los intervalos de tiempo indicados en cada caso, después de lo cual se mataron por decapitación. Se extrajeron los hígados, se colocaron en solución fisiológica fría para ser lavados y luego se secaron sobre papel de filtro y se pesaron para ser posteriormente utilizados.



I - 2. Contenido de porfirinas en el hígado.

Las porfirinas se extrajeron a partir del órgano entero según el método de Racz y Marks (269) ligeramente modificado como se describe a continuación.

El hígado del embrión de pollo (0.4 a 0.5 g) fue homogeneizado en 5 ml de una mezcla de acetato de etilo: ácido acético (4:1, v/v). Luego de centrifugar a 3000 g 15 minutos, se separó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 3 ml de la mezcla de homogeneización y se centrifugó nuevamente a 3000 g 15 minutos. El precipitado se descartó. El sobrenadante se juntó con el inicial y se volcó sobre una ampolla de decantación que contenía 12 ml de acetato de sodio 3% (p/v). Se agitó suavemente, se separó la fase acuosa inferior y luego la fase superior de acetato de etilo se lavó 2 veces más con acetato de sodio 3%.

Los lavados de acetato de sodio se reunieron y se miraron bajo la lámpara ultravioleta de Wood. Cuando estos lavados tenían fluorescencia se extraían 3 veces con acetato de etilo (5, 4 y 3 ml respectivamente). El acetato de etilo resultante de estas extracciones se lavaba con acetato de sodio 3% y se reunía con el acetato de etilo original.

En general, los lavados de acetato de sodio no presentaron fluorescencia cuando se miraron bajo la luz ultravioleta y por

lo tanto, se descartaron y se continuó trabajando con la fase de acetato de etilo original.

Los extractos de acetato de etilo se extrajeron con HCl 5% (p/v) con agitación fuerte. La fase clorhídrica inferior se filtró por papel de filtro doble (Whatman Nº 42), previamente embebido en HCl 5%. Las porfirinas fueron estimadas fluorométricamente usando un fluorómetro Beckman y coproporfirina III como patrón.

I - 3. Determinación de ALA-S.

La actividad de ALA-S en homogenato de hígado fue ensayada basándose en el método de Marver y colab. (276).

Los hígados se homogeneizaron con una mezcla de la siguiente composición: EDTA 0.5 mM, NaCl 0.9% y Tris HCl 10 mM (pH 7.2).

La mezcla de incubación para los ensayos de ALA-S contiene: 200 μ moles de glicina, 20 μ moles de EDTA, 100 μ moles de Tris HCl (pH: 7.2), 0.3 μ moles de fosfato de piridoxal y la cantidad de homogenato correspondiente a 0.125 g de hígado en un volumen final de 2 ml.

Luego de incubar 40 ó 60 minutos según se indica en cada caso, se desproteinizó con 0.5 ml de TCA 25%. En los blancos el TCA fue agregado antes que la enzima. Se dejó desproteinizando en frío al menos 1 hora y se centrifugó. En el sobrenadante se determinó el ALA formado para lo cual se ajustó el pH a 4.6 por agregado de NaOH. A 1 ml de ensayo se le agregó 1 ml de buffer

acetato 0.1 M pH: 4.6 y 0.05 ml de acetilacetona. Se calentó a 100°C durante 10 minutos y el pirrol así formado se hizo reaccionar con 2 ml del reactivo de Ehrlich modificado (277) que se prepara agregando a 1 g de p-dimetilaminobenzaldehído, 30 ml de ácido acético glacial y 8 ml de HClO_4 70% completando, finalmente, a 50 ml con ácido acético glacial.

El producto se determinó espectrofotométricamente a 555 nm utilizando un $E_{\text{mM}} = 62$ (278).

I - 4. Fraccionamiento subcelular.

Para evaluar si el aumento de ALA-S producido por malatión ocurre en mitocondrias, en citosol ó en ambos se realizó un fraccionamiento subcelular y se midió esta actividad enzimática en las distintas fracciones.

Los hígados se homogeneizaron en Sacarosa 0.25 M (pH: 7.2). A partir de cada gramo de hígado se obtuvieron 4 ml de homogenato. Se encontró que una parte importante de las mitocondrias aparece en el precipitado de 600 g correspondiente a núcleos. Así lo informan Kim y Kikuchi (279), Gross y Hutton (233) y Correia y Meyer (280). Estos últimos señalan que precipitan aquí mitocondrias unidas a sistema retículo endoplásmico y que ésta asociación tendría un significado funcional.

Por otra parte, Petersons y Allred (281) trabajando con hígado de rata encuentran que al homogeneizarlo en sacarosa 0.25M,

1/3 de la actividad de 2 marcadores mitocondriales (citrato sintetasa y 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA liasa) precipitan con la fracción nuclear y los 2/3 restantes de actividad aparecen en el precipitado de mitocondrias. Cuando el fraccionamiento subcelular se realiza con Sacarosa 0.25 M + Tris HCl 0.05 M, 80 a 95% de la actividad de los marcadores mitocondriales aparece en el precipitado de núcleos. Utilizando microfotografía se vió agregación mitocondrial en presencia de Tris CHl; mientras que con sacarosa las mitocondrias se mantienen dispersadas. Esta distribución de enzimas no se debe a células sin romper ya que no se ven células intactas por microfotografía y además 90% de la actividad de lactato deshidrogenasa, enzima citosólica, se solubiliza durante la homogeneización.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y como el objetivo del experimento, como ya se señaló, fue determinar si el aumento de actividad de ALA-S ocurre en mitocondria ó citosol, se decidió medir esta actividad en el precipitado de 11.000 g que contiene el total de mitocondrias y el sobrenadante de 105.000 g que corresponde al citosol.

Los homogenatos se centrifugaron a 11.000 g durante 20 minutos, separándose el sobrenadante y el precipitado. Este último se suspendió en sacarosa 0.25 M y se centrifugó nuevamente a 11.000g durante 20 minutos obteniéndose así un precipitado que contiene las mitocondrias. El sobrenadante resultante de esta última cen-

trifugación se juntó con el sobrenadante inicial y la mezcla se centrifugó a 105.000 g durante una hora resultando el precipitado de microsomas y el sobrenadante correspondiente a la fracción soluble.

I - 5 . Determinación de ALA-S con agregado de Succinil CoA-Sintetasa .

La Succinil CoA-Sintetasa (Succ CoA-S), que cataliza la formación de una de los sustratos de ALA-S: el succinil CoA, se encuentra en la mitocondria.

Para estudiar la distribución subcelular de ALA-S es necesario adicionar un sistema generador de succinil CoA en los ensayos correspondientes a fracciones que no contienen mitocondrias.

Por lo tanto, cuando se realizó el fraccionamiento subcelular se determinó la actividad de ALA-S en presencia de Succ CoA-S. Esta adición se realizó en todos los ensayos para igualar las condiciones de medición.

Esta determinación sólo difiere del método de Marver anteriormente descrito en los componentes de la mezcla de incubación. Esta contiene en un volumen final de 2ml: 200 μ moles de glicina, 20 μ moles de EDTA, 150 μ moles de Tris HCl (pH: 7.2), 0.3 μ moles de fosfato de piridoxal, 10 μ moles de ATP, 0.2 μ moles de coenzima A, 40 μ moles de $MgCl_2$, 10 μ moles de succinato de sodio y 0.05

unidades de Succ CoA-S.

Se define una unidad de Succ CoA-S como la cantidad de proteína que forma 1 μ mol de succinil CoA en 1 minuto.

I - 6. Obtención de Succ CoA-S.

Esta enzima se obtuvo a partir de Escherichia Coli B del cepario de la Cátedra de Microbiología e Inmunología, gentilmente cedida por el Dr. Alberto A. Viale. La bacteria se hizo crecer en un medio que contiene succinato de sodio como única fuente de carbono según lo describen Gibson y colab. (282).

La composición del medio es la siguiente: KH_2PO_4 0.02 M; K_2HPO_4 0.02 M, NH_4C 1 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, extracto de levadura (Oxoid) 0.005%; succinato disódico.6 H_2O 2.2%. Cada litro de medio se inoculó con 30 ml de un cultivo de Escherichia coli B crecida durante 10 horas en igual medio y se incubó a 37°C con agitación durante 30 horas.

Al cabo de este tiempo la suspensión de bacterias se centrifugó a 6000 g durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió en buffer fosfato 0.02 M (pH: 7.2) conteniendo MgCl_2 0.02 M; de modo que una dilución 1:100 de esta suspensión dió una absorbancia de 0.6 aproximadamente a 600 nm.

La Succ CoA-S fue preparada de acuerdo al método de Ohashi y Kikuchi (32).

Las células se sonicaron 2 veces durante 30 segundos (130

vatios/cm²) con un intervalo de 30 segundos en un sonicador modelo W 185 D de Heat System Ultrasonic Inc.

Luego se centrifugaron a 10.000 g 15 minutos. El sobrenadante resultante se trató con (NH₄)₂SO₄ de modo de obtener las proteínas que precipitan entre 50 y 65 % de saturación.

Este precipitado se resuspendió en buffer Tris HCl 0.1 M pH: 7.2 y se sembró en una columna de Sephadex G-25 que fue equilibrada y eluida con ese mismo buffer.

El eluido fue recogido en varios tubos. En cada uno de ellos se determinó la presencia de SO₄⁼ por precipitación con BaCl₂ y la de proteínas mediante la medición de las absorbancias a 260 y 280 nm. Los tubos que contenían proteínas y carecían de SO₄⁼ se juntaron y se utilizaron como fuente de enzima.

Esta preparación no presentó actividad de ALA-S.

La actividad específica de Succ CoA-S en la misma se determinó midiendo la actividad de la enzima por el método de Kaufman (283) y la cantidad de proteína por el método de Lowry (284), ambos se describen a continuación.

La fracción precipitada entre 50 y 65% de saturación con (NH₄)₂SO₄ se conservó en congeladora; bajo estas condiciones resultó estable por varios meses.

I - 7. Determinación de Succ CoA-S.

Como ya se ha mencionado se utilizó el método de Kaufman

(283). El medio de incubación contiene: 100 μ moles de Tris HCl (pH: 7.4), 100 μ moles de succinato de sodio, 10 μ moles de ATP, 0.13 μ moles de coenzima A, 20 μ moles de glutatión reducido, 10 μ moles de $MgCl_2$, 0.96 mmoles de hidroxilamina y la solución de enzima en un volumen final de 2 ml. Se incubó a 37°C con agitación durante 30 minutos. Finalizada la incubación se agregó 1 ml de la mezcla desproteinizante que contiene iguales volúmenes de $FeCl_3$ 5%, HCl 3N y TCA 12%. En los blancos se agregó la mezcla desproteinizante antes que la enzima.

Luego de centrifugar se determinó la absorbancia en el sobrenadante a 540 nm.

Esta medición está basada en la formación de ácido succinicohidroxámico a partir de succinil CoA e hidroxilamina el cual se determina por el reactivo de $FeCl_3$ de Lipmann y Tuttle (285).

La curva de calibración se realizó con anhídrido succínico ya que este forma el ácido succinicohidroxámico (283), obteniéndose un valor de $1/\text{pendiente} = 2.4 \mu\text{moles}$.

I - 8. Determinación de proteínas.

La medición de proteínas se hizo por el método de Lowry (284) utilizando solución alcalina de cobre y reactivo de Folin.

Las muestras fueron convenientemente diluidas de modo de usar 0.1 ó 0.2 ml por ensayo.

Una vez agregada la muestra se llevó a 0.4 ml con agua y se adicionaron 2 ml de solución alcalina de cobre. Después de 10 minutos se agregaron 0.2 ml de reactivo de Folin, se agitó y se dejó durante 30 minutos. Luego se determinó la absorbancia a 660 nm. La curva de calibración se realizó con albúmina bovina obteniéndose un valor de $1/\text{pendiente} = 0.2 \text{ mg}$.

I - 9 . Determinación de Succínico Deshidrogenasa .

Cuando se realizó el fraccionamiento subcelular se utilizó como marcador mitocondrial la enzima Succínico Deshidrogenasa (SDH), que esta localizada en la membrana interna de la mitocondria.

Esta actividad fue medida de acuerdo al método de Pennington (286). El medio de incubación contiene en un volumen final de 1 ml : buffer fosfato 50 mM pH: 7.4, succinato de sodio 50 mM, sacarosa 25 mM y cloruro de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)5-fenil tetrazolio (INT) 0.1%. Los blancos fueron incubados sin succinato de sodio. Se incubó durante 15 minutos a 37°C y luego se desproteinizó por agregado de 1 ml de TCA 10%. El producto de la reducción del INT, el formazán, se extrajó con 4 ml de acetato de etilo y se determinó la absorbancia a 490 nm. Se definió una unidad de SDH como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de INT

dando un incremento de 1 en la absorbancia a 490 nm en las condiciones de ensayo empleadas.

I - 10. Determinación de Glutamato Deshidrogenasa.

La Glutamato Deshidrogenasa (GDH) es una enzima localizada en la matriz mitocondrial y también fue utilizada como marcador mitocondrial en el fraccionamiento subcelular.

La actividad de GDH se midió según el método de Beaufay y colab. (287) ligeramente modificado.

La mezcla de incubación contiene: buffer Tris HCl 0.04 M pH: 8, KCN 0.4 mM, Tritón X 100 0.1%, EDTA 1 mM, α cetoglutarato 0.01 M, NH_4Cl 0.1 M, NADH 0.28 mM y enzima en un volumen final de 3 ml. Se preincubó la enzima con todos los componentes de la mezcla de reacción excepto el α cetoglutarato a 25°C durante 15 minutos. Luego se comenzó la reacción con la adición de α cetoglutarato y se midió el decremento de absorbancia a 340 nm contra un blanco que contiene NADH 0.22 mM y todos los otros componentes del sistema menos α cetoglutarato.

Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima que causa un decremento de absorbancia de 0.01 en 10 segundos bajo las condiciones de ensayo empleadas.

I - 11. Determinación de Ferroquelatasa.

La actividad de ferroquelatasa fue medida según una modificación del método de Cole y colab. (220).

Los hígados se homogeneizaron en Sacarosa 0.25 M (pH: 7.4). A partir de 1 g de hígado se obtuvieron 5 ml de homogenato. Este se centrifugó a 11.000 g durante 20 minutos; las mitocondrias así obtenidas se lavaron 2 veces con Tris HCl 0.02 M pH: 8.2.

La solución de mesoporfirina IX, utilizada como sustrato, se preparó según lo describen Porra y colab. (288). Se disuelve la porfirina en un pequeño volumen de NH_3 2N. La solución se diluye con un poco de agua, se lleva a pH 8.2 con HCl y se agrega Buffer Tris HCl pH: 8.2 de modo de obtener una concentración final de buffer de 0.01 M. Finalmente se agrega 0.2 vol. de Tween 80 1% (p/v). Para obtener la concentración de la solución se hace una dilución conveniente con HCl 0.1 N y se mide la absorbancia a 399 nm. Se utiliza un $\text{EmM} = 445$ (289).

Para determinar la actividad de ferroquelatasa el medio de incubación contiene en un volumen final de 3.5 ml: 120 nmoles de mesoporfirina IX, 0.45 nmoles de Tris HCl pH: 8.2, 12 μmoles de ditiotreitól, 120 μmoles de FeSO_4 , 0.3 ml de Tween 80 1% (p/v), 0.3 ml de etanol y la suspensión en Tris HCl 0.2 M pH: 8.2 de las mitocondrias correspondientes a 0.2 g de hígado aproximadamente.

Antes de incubar se hizo vacío durante 5 minutos y luego se inyec
tó nitrógeno durante 1 minuto. Se incubó a 37°C durante 1 hora con
agitación. Al finalizar la incubación se agregaron 0.5 ml de yodo
acetamida 0.4 M, se dejó unos minutos y luego se adicionó 1 ml de
piridina y 0.5 ml de NaOH 1 N. Se midió la diferencia de absorban
cias a 543 y 531 nm usando un $\Delta E_{mM} = 21.7$ de acuerdo con Porra y
Jones (155).

II - TRABAJO CON RATAS.

II - 1. Tratamiento de los animales.

Se trabajó con ratas macho de la cepa Wistar, de aproxi-
madamente 250 g de peso, a las que se les administró diariamente
lindano por sonda gástrica en dosis de 40 a 50 mg/Kg de peso. Se
utilizaron 3 lotes: a) normal, b) tratado con 3 ml de una suspen
sión por medio de Tween 20 de 5 mg de lindano/ml y c) tratado con
0.25 ml de una solución de 60 mg de lindano/ml de aceite de gira-
sol.

Se analizó una vez por semana la excreción de ALA, PBG y
porfirinas en orina y Copro y Proto en heces en 4 ratas de cada
lote. El tiempo de duración de los tratamientos se indica en cada
gráfico.

Una vez finalizado el tratamiento las ratas se mataron por
decapitación, se extrajeron los hígados, se colocaron en solución

fisiológica fría para lavarlos, se secaron sobre papel de filtro y se pesaron.

A continuación se emplearon para determinar las actividades hepáticas de ALA-S y PCL.

II - 2. Preparación de las resinas Dowex.

II - 2_a. Resina aniónica.

Se utilizó una resina aniónica Dowex A.G. 1-X₈, 200-400 mesh. Si la resina se adquiere en la forma acetato puede ser utilizada luego de suspenderla en agua y dejarla decantar varias veces hasta que el líquido sobrenadante sea completamente claro.

Si esta en la forma Cl⁻ se trata 3 veces con 4 volúmenes de solución de acetato de sodio 3M durante 6 horas. Luego se lava con agua hasta reacción negativa de acetato en el eluido. Esto se comprueba por adición de AgNO₃.

II - 2_b. Resina catiónica.

Se utilizó una resina catiónica Dowex A.G. 50-X₈, 200-400 mesh. La resina fue convertida primero a su forma Na⁺ por tratamiento en batch (1:1) con NaOH 2N, luego se lavó con agua hasta neutralidad y finalmente se convirtió en su forma ácida por tratamiento con 1 volumen de HCl 4N y luego 6 volúmenes de HCl 2N, HCl 1 N y agua sucesivamente.

II - 3. Determinación de ALA, PBG y porfirinas en orina.

ALA, PBG y porfirinas fueron aisladas a partir de la orina usando columnas de intercambio aniónico (Dowex 1) y catiónico (Dowex 50) de acuerdo con el método de Piper y colab. (290). Se utilizaron columnas de vidrio de 18 cm de alto y 1 cm de diámetro. Luego de colocar una pequeña cantidad de lana de vidrio en la parte inferior se cargó cada columna con 2 ml de resina (aniónica ó catiónica) que habían sido tratadas como se detalló anteriormente (Sección II-2.).

El pH de la orina se ajustó a 5.5. Cuando la orina era inicialmente más ácida se agregó acetato de sodio saturado para llevar a pH. En cambio, si estaba por encima del pH deseado primero se acidificó con HCl concentrado hasta pH: 4, se agitó para disolver los fosfatos presentes y luego se agregó acetato de sodio saturado para llevar a pH: 5.5.

Se sembró 1 ml de orina, ajustada a pH, sobre una columna de resina Dowex 1. Luego se lavó 2 veces con 3 ml de agua. Se reunieron el eluido inicial y el de los lavados y se lo conservó para la determinación de ALA.

El PBG retenido en la columna se eluyó con 3.5 ml de ácido acético 1 N. Se comprobó que había sido eliminado totalmente probando sobre una placa de toque la falta de coloración desarrollada por las últimas gotas del eluido con el reactivo de Ehrlich.

A continuación se eluyeron las porfirinas con HCl 10% hasta que no se detecta fluorescencia bajo la luz ultravioleta en el eluido. El eluido inicial de la resina aniónica junto con los lavados acuosos se sembraron sobre una columna de resina Dowex 50. Después se lavó con aproximadamente 30 ml de agua para eliminar la urea fundamentalmente. Esta produce al reaccionar con el reactivo de Ehrlich un color amarillo característico. Se continuó agregando agua hasta reacción negativa del eluido con el reactivo de Ehrlich. Luego se lavó con 2 ml de acetato de sodio 0.5 M. Finalmente el ALA se eluyó con 8 ml de acetato de sodio 1 M y se llevó a 10 ml con buffer acetato 2 M pH: 4.6; se le agregaron 0.2 ml de acetil acetona y se calentó en un baño de agua a ebullición durante 10 minutos. Una alícuota de 1.5 ml se hizo reaccionar con 1.5 ml de reactivo de Ehrlich en ácido perclórico 2 N (277). Se hace un blanco con 8 ml de acetato de sodio 1 M tratados de igual modo que la muestra. Al cabo de 15 minutos se lee la absorbancia a 555 nm y se calcula los $\mu\text{g ALA}/24$ horas utilizando un $E_{mM} = 62$ (278). Para cuantificar el PBG a una alícuota del eluido de ácido acético 1 N se agregó 1.5 ml del reactivo de Ehrlich y después de 10 minutos se midió la absorbancia a 555 nm. El contenido de PBG en $\mu\text{gPBG}/24$ horas se calcula utilizando un $E_{mM} = 62$ (291).

Las porfirinas se midieron espectrofotométricamente determinándose las absorbancias correspondientes a la longitud de onda máxima, 380 y 430 nm y aplicando la ecuación de corrección de Ri-

mington-Sveinsson (292), que aparece a continuación, para obtener la absorbancia corregida de la muestra.

$$A \text{ corregida} = \frac{2 A_{\text{max}} - (A_{380 \text{ nm}} + A_{430 \text{ nm}})}{1.84}$$

El eluido de porfirinas se diluyó al medio con agua para obtener una solución de porfirinas en HCl 5%. Teniendo en cuenta que la absorbancia máxima de la solución correspondía a la longitud de onda de la Copro (401 nm) se utilizó su coeficiente en HCl 5% (1.7 µg/ml) para calcular los µg de porfirinas excretados en 24 horas. Esta valoración del contenido de porfirinas coincide con la informada por Halti y colab. (293).

II - 4. Regeneración de las resinas.

Una vez utilizada la resina aniónica se trata con 20 ml de acetato de sodio 3 M y luego con agua hasta ausencia de acetato en el eluido lo que se comprueba por agregado de AgNO₃.

La resina catiónica se trata sucesivamente con 6ml de HCl 4N 2N y 1 N. Después se lava con agua hasta cloruros negativos.

Luego de estos tratamientos las resinas están en condiciones de ser empleadas nuevamente.

II - 5. Determinación de Copro y Proto en heces.

Se midieron las porfirinas fecales según el método de

Rimington (294) ligeramente modificado.

Se tomaron 100 mg del total de heces recogidas durante 24 horas y se les agregó 2 ml de ácido acético y 7 ml de eter etílico. Luego de desmenuzar bien la mezcla se centrifugó 5 minutos a 2000 g. El sobrenadante se guardó y al precipitado se le repitió el tratamiento anterior.

Se combinaron los 2 sobrenadantes etéreos y se colocaron en una ampolla donde se hicieron 2 lavados con 3 ml de acetato de sodio 3%. Se reunieron los lavados de acetato de sodio en otra ampolla y se lavaron 2 veces con 1 ml de éter. Estos lavados con éter se agregaron a la ampolla que contenía la solución etérea original y se extrajo la Copro con HCl 0.1 N, utilizando 2 ml aproximadamente cada vez hasta fluorescencia negativa bajo la luz ultravioleta.

Luego se extrajo la Proto con HCl 5% (p/v) 2 ml cada vez, hasta fluorescencia negativa.

El contenido de Copro y Proto se cuantificó espectrofotométricamente utilizando los coeficientes dados por Rimington (294). Este autor trabaja con heces secas y expresa los valores como μg de Copro ó Proto/g de peso seco; aquí, en cambio, se trabajó con las heces sin secar considerando la totalidad de la excreción durante 24 horas y, por lo tanto, se informa μg de Copro ó Proto/24 horas.

II - 6. Determinación del contenido de porfirinas en el hígado.

Los hígados se homogeneizaron en KCl 0.15M. A partir de 1 g de hígado se obtuvieron 5 ml de homogenato. Cada homogenato se desproteinizó con un volumen de HCl concentrado tal que su concentración final fuese de 5% (p/v). El precipitado se filtró y lavó con HCl 5% hasta fluorescencia negativa bajo la lámpara ultravioleta. La cantidad de porfirinas se estimó espectrofotométricamente del mismo modo que se ha descrito en orina.

II - 7. Determinación de ALA-S.

Se utilizó el método de Marver ya descrito para embriones de pollo (276). A partir de cada gramo de hígado se obtuvieron 3 ml de homogenato. La mezcla de incubación contiene en un volumen final de 2ml: 200 μ moles de glicina, 20 μ moles de EDTA, 160 μ moles de Tris HCl pH: 7.2 y 0.5 ml de homogenato. Se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación, luego se desproteinizó con 0.5 ml de TCA 25% y se siguió el mismo procedimiento descrito para embriones de pollo (Sección I-3.).

II - 8. Determinación de PCL.

La actividad de PCL fue medida según el método descrito por San Martín de Viale y colab. (238).

Los hígados de las ratas se homogeneizaron en KCl 0.154 M de modo de obtener 5 ml de homogenato a partir de cada gramo de hígado. Cada homogenato se centrifugó a 11.000 g durante 20 minutos. El precipitado se descartó y el sobrenadante se utilizó como fuente de enzima. La mezcla de reacción contiene en un volumen final de 3 ml: buffer fosfato de potasio 67 mM pH: 7; glutatión reducido 1 mM, EDTA 0.1 mM, uroporfirinógeno III 2 μ M y 0.3 ml del sobrenadante post-mitocondrial que contiene entre 7 y 11 mg de proteínas. El porfirinógeno se pipetea en oscuridad bajo una tenue luz roja.

Se incubó a 37°C anaerobicamente, en tubos de Thunberg, y en oscuridad durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se colocan los tubos en hielo, se abren y se pipetea HCl concentrado de modo de obtener una concentración final en HCl del 5%.

Se dejan durante 30 minutos en frío bajo luz blanca para que se desproteínicen y que los porfirinógenos se oxiden a porfirinas. Luego se retiran del frío, se filtran a través de papel SS595 plegado y previamente embebido en HCl 5% y se recoge en erlenmeyers de 25 ml. Se enjuagan la cabeza y el cuerpo del tubo de Thunberg con HCl 5% hasta fluorescencia negativa bajo la lámpara ultravioleta, se filtra y se agrega a los erlenmeyers. Estos se ponen en desecador y se hace vacío para evaporar el líquido. Una vez secas las porfirinas se esterifican, se pasan a cloroformo y se realizan las cromatografías como se describe más adelante.

La primera etapa de la actividad de PCL, es decir, la descarboxilación de uroporfirinógeno, se expresa como la formación de porfirinas hepta- + hexa- + penta- + tetra - carboxílicas/30 minutos x mg de proteína. La segunda etapa de actividad de PCL, es decir la formación de coproporfirinógeno se expresa con coproporfirina formada/30 minutos x mg de proteína (295). Las proteínas se determinaron por el método de Lowry y colab. (284) anteriormente descrito.

II - 9. Preparación de uroporfirinógeno III.

El uroporfirinógeno III se prepara teniendo en cuenta los métodos de Fisher y Stern (296) y de Mauzerall y Granick (115) que se basan en la reducción de una solución de porfirinas libres con amalgama de sodio (3%) en medio básico.

Para preparar la amalgama de sodio se calientan 30 g de mercurio a 30-40°C en cápsula de porcelana y con una varilla de vidrio larga y de punta estirada se pinchan y se agregan de a uno trozos pequeños de Na (1 g) recientemente cortado y mantenido en kerosene incoloro. Esta operación debe realizarse con mucho cuidado, sobre todo los primeros agregados ya que la reacción es violenta. Se trabaja bajo campana con cuidado debido a los vapores de Hg y a las proyecciones que se producen por el agregado de Na.

La amalgama, que endurece al enfriar, se guarda en un frasco

seco y bien cerrado que se coloca dentro de otro recipiente que contiene cloruro de calcio.

Para preparar el uroporfirinógeno III la amalgama de sodio recientemente pulverizada se agrega a una solución de uroporfirina III en NaOH 25 mM (0.2 a 1 g de amalgama/ml de solución) y se agita vigorosamente. Al cabo de 10 ó 20 minutos se produce la reducción a uroporfirinógeno lo que se comprueba por la pérdida de color y de fluorescencia bajo la luz ultravioleta de la solución.

A continuación se filtra bajo vacío a través de una plaquita filtrante de poro fino, provista de un pequeño papel. Se lleva a pH 7 - 7.2 con H_3PO_4 40% (p/v) bajo atmósfera de N_2 y se mantiene el tubo kitasato en hielo hasta el momento de ser pipeteado. Esta operación debe ser realizada lo más rápidamente posible (297).

La preparación del porfirinógeno se realiza bajo una tenue luz roja.

II - 10 . Esterificación de las porfirinas.

La solución de porfirinas libres previamente llevadas a sequedad en desecador se disuelven en 20 ml de una mezcla de MeOH- H_2SO_4 (19:1, v/v). Se deja esterificar durante 24-48 horas en oscuridad y a temperatura ambiente.

II - 11. Pasaje a cloroformo.

Finalizada la esterificación de la solución de porfirinas se le agrega medio volumen de cloroformo y se lleva a pH: 4.5 con acetato de sodio saturado.

Se coloca agua destilada en una ampolla de decantación y se agrega la solución anterior. Se agita y se forman 2 fases una fase clorofórmica inferior que se separa y una acuosa que se mantiene en la ampolla y se extrae con cloroformo hasta fluorescencia negativa. Los extractos clorofórmicos se reúnen. Primero se repite un lavado con agua destilada y finalmente se lava con NaCl 7%. En este último caso se agita vigorosamente para romper la emulsión. Se extrae el NaCl 7% con cloroformo hasta fluorescencia negativa. Los extractos clorofórmicos se filtran a través de papel previamente embebido en cloroformo y se recogen en un balón de destilación con cuello esmerilado donde luego se lleva a sequedad en baño maría y bajo vacío. El residuo de ésteres metílicos de porfirinas, así obtenido, se analiza posteriormente por cromatografía en papel.

II - 12. Identificación de las porfirinas. Cromatografía en papel de sus ésteres metílicos.

Las cromatografías en papel se realizaron de acuerdo al método de Falk y Benson (298) que permite la separación de los

ésteres metílicos de Uro, Hepta, Hexa, Penta, Copro y Proto enumeradas de menor a mayor movilidad. Es decir que la movilidad aumenta al disminuir el número de grupos -COOH presentes.

Consta de 2 cromatografías ascendentes. En la primera la cuba se satura con cloroformo y el solvente de desarrollo es cloroformo: kerosene (2:1; v/v). Esta corrida tiene por objeto dejar las impurezas en la línea de siembra que se descarta. En la segunda corrida la cuba se satura con dioxano y el solvente de desarrollo es kerosene: dioxano (2.5:1, v/v).

Se revela bajo la luz ultravioleta marcándose con lápiz la zona correspondiente a cada porfirina. Se corta el papel y cada banda se eluye con cloroformo en un vaso de precipitado pequeño y se trasvasa a un tubo graduado. Se repiten las eluciones hasta fluorescencia negativa del papel. Se miden los volúmenes eluidos y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro DB. Se busca entre 400 y 410 nm el máximo correspondiente a cada porfirina. Se calculan los nmoles de cada una en la cromatografía sembrada, usando la recíproca de los coeficientes de extinción dados por Salum y colab. (299). Para las porfirinas de 5- y 6-COOH se usan los valores calculados por interpolación entre los correspondientes a las porfirinas de 7- y de 4-COOH, suponiendo una función lineal entre el número de grupos -COOH y la recíproca del coeficiente de extinción como informaron Tomio y colab. (111). Conociendo estos resultados y los nmoles totales recuperados en la cromato-

grafía se obtuvieron los porcentajes de cada una de las porfirinas en la mezcla.

III - TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

Se utilizó el método gráfico de Rankits (300) para estudiar la normalidad de las poblaciones.

Se usaron como medida de tendencia central la media y mediana y como medida de dispersión el error standard y el rango, según corresponda.

Se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon (301) para analizar la diferencia de 2 muestras. El nivel de significancia se fijó en $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

I - EFECTO DE: CLORDANO, ENDOSUL-
FAN, PARATION Y MALATION SOBRE
EL CONTENIDO DE PORFIRINAS Y
LA ACTIVIDAD DE ALA-S EN HIGA-
DO DE EMBRIONES DE POLLO.

RESULTADOS.

I - 1. CONTENIDO HEPATICO DE PORFIRINAS.

I - 1a. Efecto del clordano sobre el contenido hepático de porfirinas.

Esta droga fue ensayada en diferentes dosis desde 0.5 hasta 10 mg/huevo. Como puede verse en la Figura 18, este plaguicida incrementa el contenido hepático de porfirinas. Los incrementos observados fueron estadísticamente significativos en las dosis de 2.5; 5 y 10 mg/huevo, pero no en las menores dosis ensayadas (0.5; 1 y 2 mg/huevo).

Analizando los valores obtenidos con las distintas dosis ensayadas se observa que los aumentos más importantes se encontraron con las dosis de 2.5 y 5 mg/huevo. En la primera de estas dosis apareció un valor muy alto (16.97 μ g de porfirinas/g. de hígado). Es importante señalarlo aunque no se repitió un valor similar.

Se estudió el efecto de FB, SKF 525A y DDC sobre la acumulación de porfirinas provocada por clordano utilizando la dosis de 5 mg/huevo, con el objeto de ver si alguno de estos tratamientos estimula dicha acumulación.

Como puede verse en la Figura 19, el clordano en la dosis indicada (Cl 5) produce un aumento significativo del contenido hepático de porfirinas el cual no se incrementa por el pretratamiento

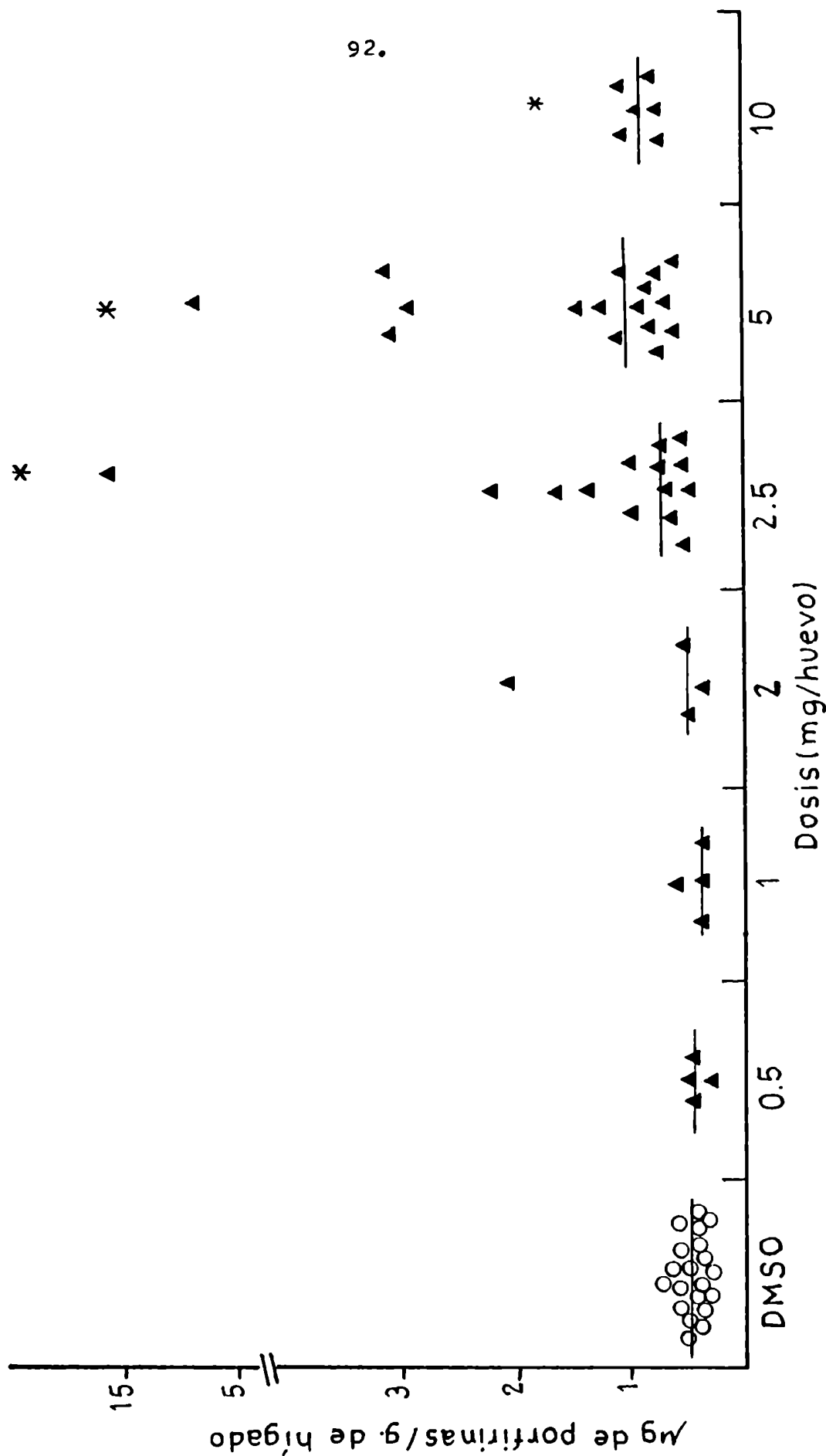


Figura 18: Efecto de diferentes dosis de clordano sobre el contenido hepático de porfirinas. Se grafican los valores obtenidos con cada embrión. Para cada dosis la mediana se representa por (—). Significativamente diferente del control de DMSO: * $p < 0.002$, ** $p < 0.01$.

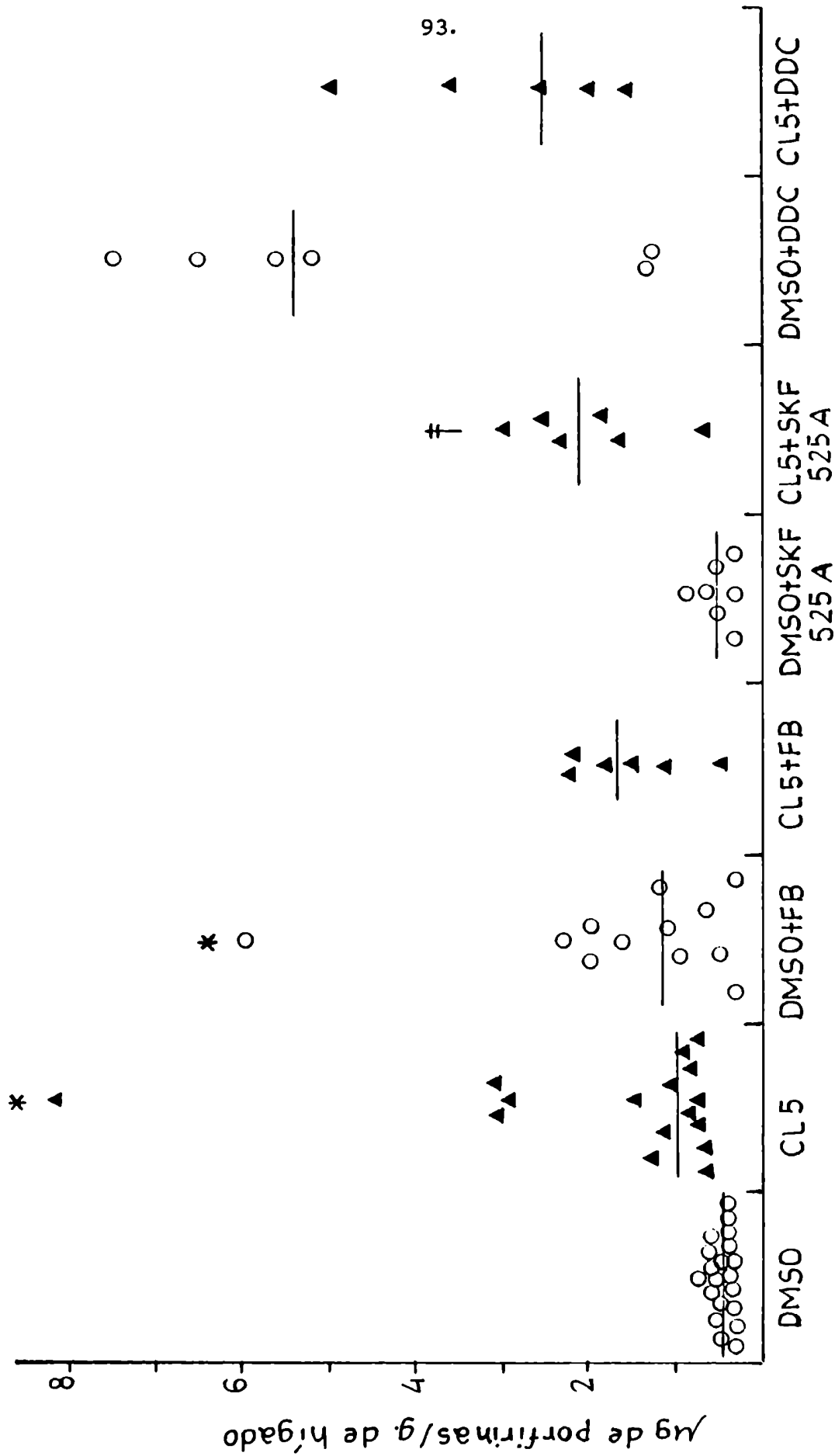


Figura 19: Efecto de FB, SKF 525A y DDC sobre la acumulación de porfirinas producida por clordano en la dosis de 5 mg/embrión (CL5). Los otros detalles son como se indica en la Figura 18.

*Significativamente diferente del control de DMSO: $p \leq 0.002$. †Significativamente diferente del control de DMSO + SKF 525A: $p < 0.01$.

con FB. Por otro lado, si se compara el control con FB (DMSO + FB) respecto al control de DMSO se encuentra un aumento significativo del contenido de porfirinas lo que indica un efecto "per se" del FB sobre este metabolismo.

Debido a este hecho si se analiza la diferencia entre DMSO + FB y C15 + FB esta no es significativa. Es decir que el FB no favorece la respuesta de esta droga.

Cuando se estudió el efecto del SKF 525A se encontró que los valores hallados para los controles con y sin SKF 525A eran similares. Lo mismo ocurrió para la droga con y sin inhibidor (C15 y C15 + SKF 525A). Así los incrementos frente a sus respectivos controles en presencia y ausencia de SKF 525A fueron semejantes, ambos son estadísticamente significativos.

El DDC produce una acumulación importante de porfirinas y ésta no se ve aumentada en presencia de clordano, por el contrario ni siquiera se alcanza la respuesta del DDC sólo. Si bien el decremento entre C15 + DDC y DMSO + DDC no es estadísticamente significativo.

I - 1 b . Efecto del endosulfan sobre el contenido hepático de porfirinas.

Se estudió el efecto de este plaguicida en dosis que van desde 0.25 hasta 9 mg/huevo. Como puede verse en la Figura 20 sólo en la menor dosis no produce un aumento significativo del contenido

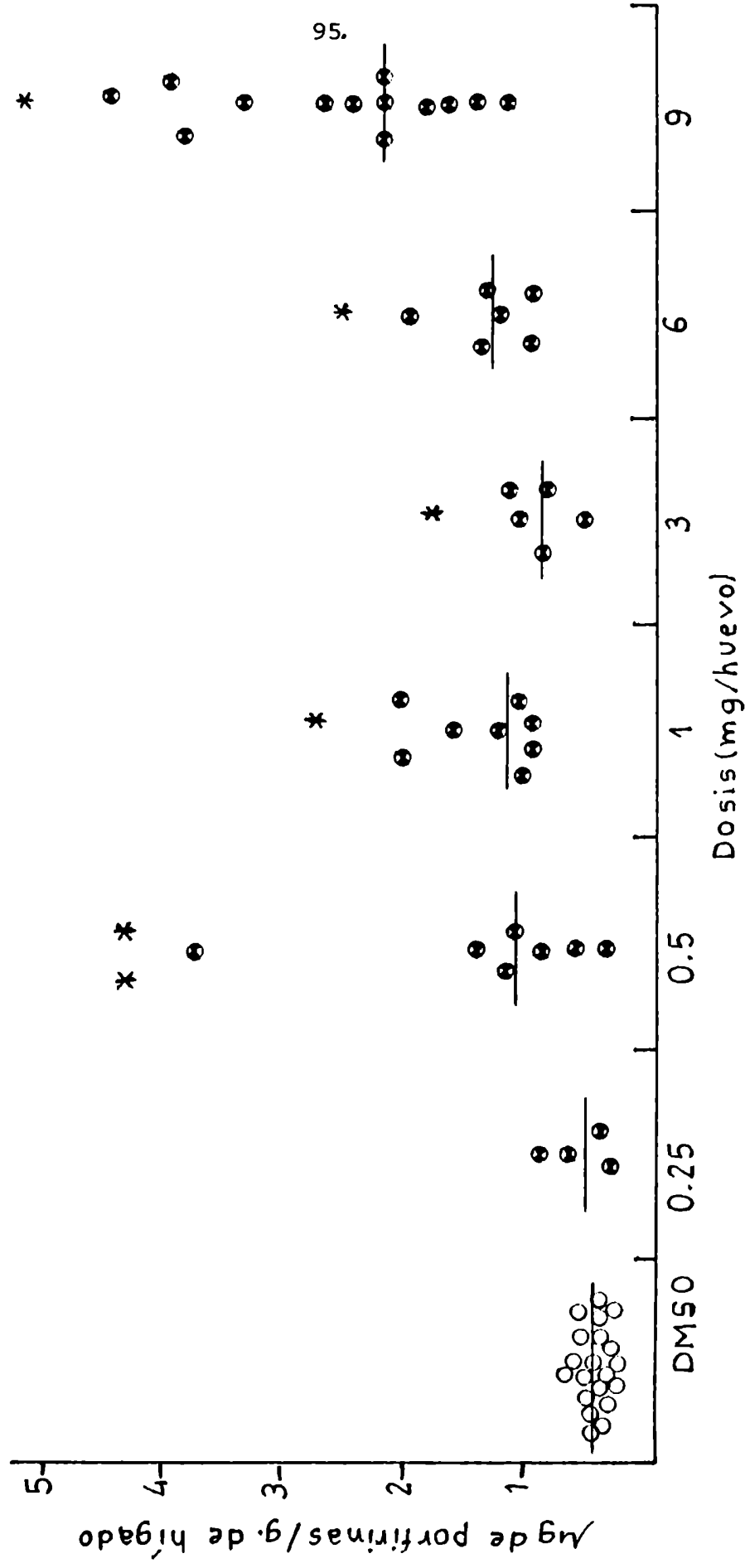


Figura 20: Efecto de diferentes dosis de endosulfan sobre el contenido hepático de porfirinas. Los otros detalles son como se indica en la Figura 18. *Significativamente diferente del control de DMSO: $p < 0.002$

de porfirinas. Todas las otras dosis producen incrementos siendo la de 9 mg/huevo la más efectiva ya que el valor de la mediana hallado es aproximadamente 5 veces superior al del control ($2.3 \mu\text{g}/\text{g}$ de porfirinas/g. de hígado frente a 0.48 para los controles).

Para evaluar el efecto del FB, SKF 525A y DDC se trabajó con la dosis de 9 mg/embrión (E9).

Los resultados obtenidos aparecen en la Figura 21.

Si se analiza la acción del FB se ve que los valores encontrados con la droga sola (E9) y en presencia de FB (E9 + FB) son similares pero como el valor del control con FB es superior al del control sin FB, la diferencia en presencia de FB no es significativa mientras que la diferencia entre E9 y DMSO es significativa.

Los valores obtenidos para la droga con y sin SKF 525A son similares y como los controles también lo son, los incrementos resultan análogos y estadísticamente significativos en ambos casos.

Con DDC y el plaguicida (E9 + DDC) no se logra una acumulación superior a la del control (DMSO + DDC). Tampoco en este caso se mejora la respuesta con este tratamiento.

I - 1c. Efecto del paratión sobre el contenido hepático de porfirinas.

Su efecto se estudió con diferentes dosis como puede verse en la Figura 22. Todas ellas incrementan el contenido de porfirinas en el hígado significativamente. Los incrementos más importantes

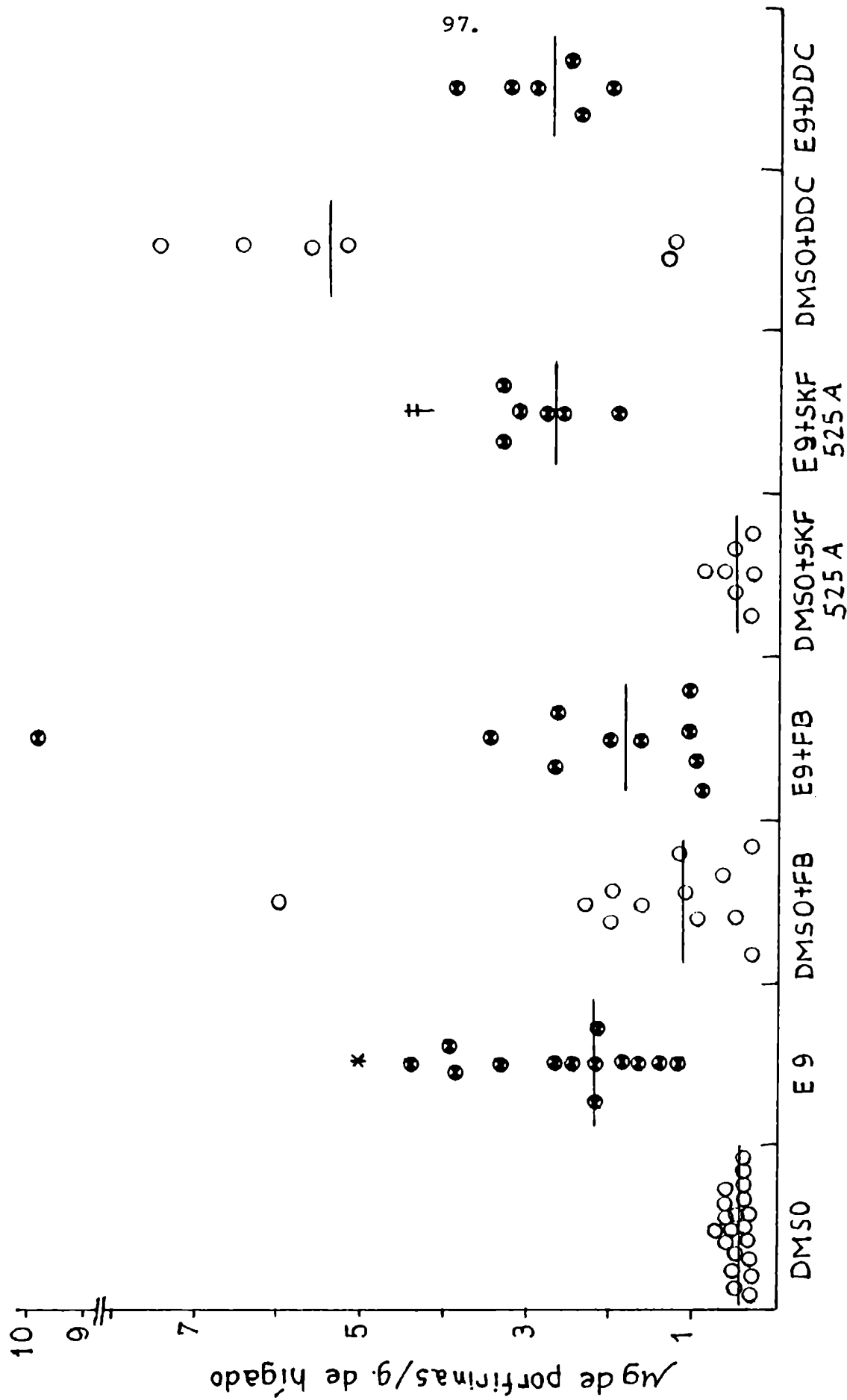


Figura 21: Efecto de FB, SKF 525A y DDC sobre la acumulación de porfirinas producida por endosulfan en la dosis de 9 mg/embrión (E9). Los otros detalles son como se indica en la Figura 18.

*Significativamente diferente del control de DMSO: $p < 0.002$. †Significativamente diferente del control de DMSO + SKF 525A: $p \leq 0.002$.

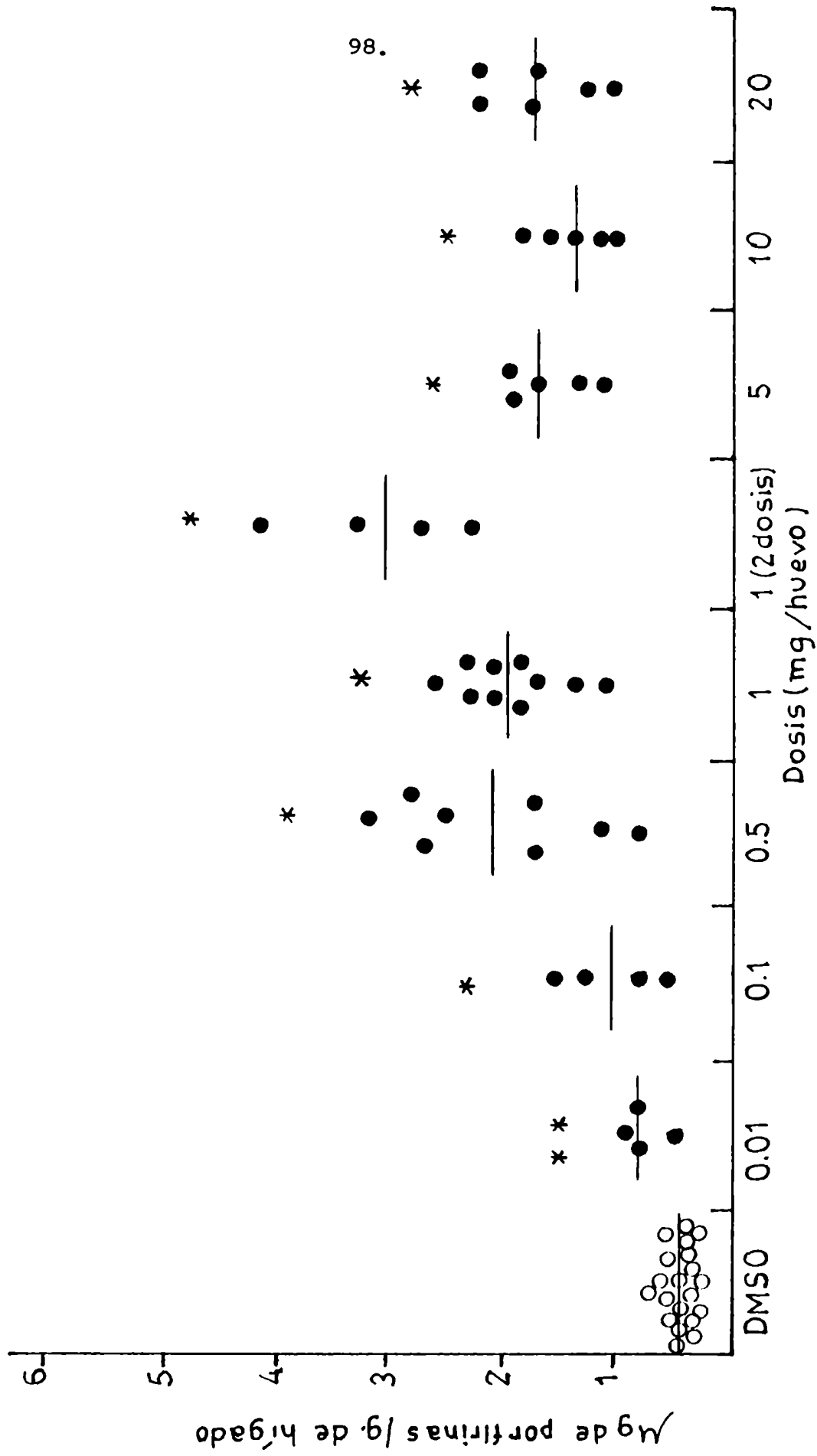


Figura 22: Efecto de diferentes dosis de paratuberculosis sobre el contenido hepático de porfirinas. Los otros detalles son como se indica en la Figura 18. Significativamente diferente del control de DMSO: * $p < 0.002$; ** $p < 0.01$.

tes se encontraron con la dosis de 0.5 y 1 mg/embrión donde el contenido de porfirinas se elevó aproximadamente 4 veces si se comparan los valores de las medianas hallados para cada una de estas dosis con la del control de DMSO.

Así mismo se estudió el efecto de la repetición de la dosis dando una segunda inyección 2 horas después de la primera. Esto se hizo con la dosis de 1 mg/embrión (Figura 22). Este tratamiento mejoró la respuesta de esta droga siendo la mediana obtenida de 3.1 ug de porfirinas/g. de hígado que representa un incremento de 6.6 veces respecto al control de DMSO y 1.6 veces respecto a la única dosis de paratión.

En los experimentos con FB, SKF 525A y DDC se utilizó la dosis de 0.5 mg/embrión (Figura 23).

En cuanto al FB se encuentra que el incremento hallado en su presencia entre la droga (P 0.5 + FB) y el control (DMSO + FB) no es estadísticamente significativo, en cambio sí lo es para la droga sola (P 0.5) y el control (DMSO). Tampoco en este caso el FB favorece la respuesta de la droga. Los valores hallados con paratión en presencia y ausencia de SKF 525A son similares al igual que los valores de los respectivos controles (DMSO + SKF 525A y DMSO); aunque al analizar la diferencia entre DMSO + SKF 525A y P 0.5 + SKF 525A no resulta significativa a nivel de $p = 0.05$. Teniendo en cuenta estos resultados este inhibidor del metabolismo de drogas no mejoró la respuesta del paratión.

Tampoco se encontró aumento de la acumulación de porfirinas al bloquear el pasaje de proto IX a hemo con DDC (Figura 23).

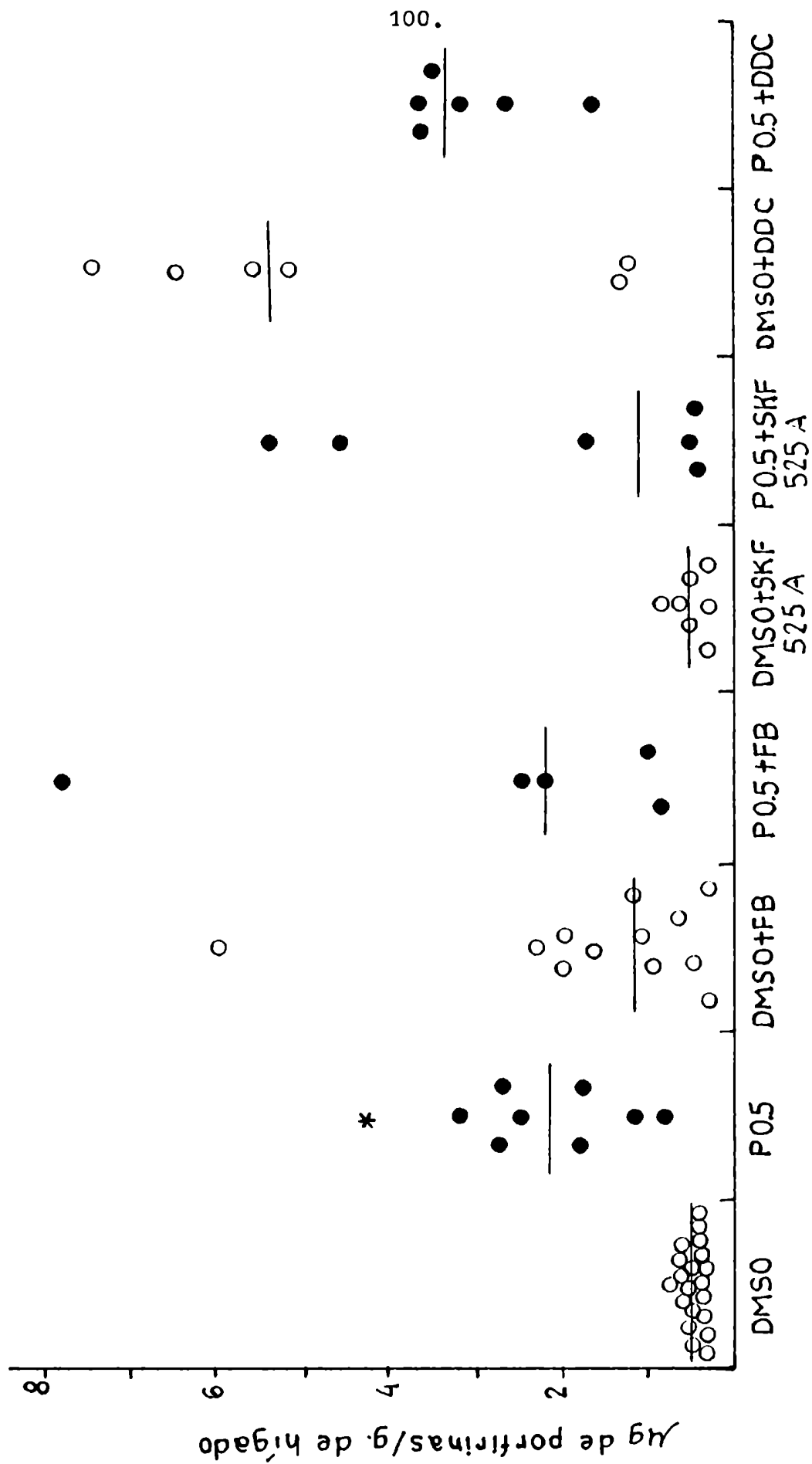


Figura 23: Efecto de FB, SKF 525A y DDC sobre la acumulación de porfirinas producida por paratión en la dosis de 0.5 mg/embrión (P 0.5). Los otros detalles son como se indica en la Figura 18.

*Significativamente diferente del control de DMSO: $p \leq 0.002$.

I - 1d. Efecto del malatión sobre el contenido hepático de porfirinas.

Como puede verse en la Figura 24 el malatión altera poco el contenido hepático de porfirinas. Aunque varias dosis produjeron incrementos significativos éstos fueron pequeños. Sin embargo es interesante señalar que un valor muy elevado de 33 μ g de porfirinas/g de hígado apareció en la dosis de 40 mg/huevo, ya que el resto de las determinaciones no superan los 2 ó 3 μ g de porfirinas/g de hígado. Teniendo esto en cuenta se insistió con estas dosis pero un valor similar no pudo ser obtenido.

De todos modos para investigar aún más la respuesta de esta dosis, se estudió el efecto de prolongar el período de incubación con la droga a 48 horas. Es decir, después de 48 horas de incubación se extrajeron los hígados y se determinó el contenido de porfirinas. Se estudió también, el efecto de una segunda inyección de 40 mg de malatión durante las 48 horas de incubación. Esta segunda inyección se dió 24 horas después de la primera.

Si se observa la Figura 25 se ve que ambos tratamientos mejoraron la respuesta.

Se trabajó con la dosis de 60 mg/embrión para estudiar el efecto de FB, SKF 525A y DDC sobre la acumulación de porfirinas producidas por malatión. Los resultados obtenidos aparecen la Figura 26. Tanto la droga sola (M 60) como en presencia de FB (M 60 + FB) produjo incrementos significativos del contenido hepático de porfirinas respecto a los controles correspondientes (DMSO y DMSO + FB

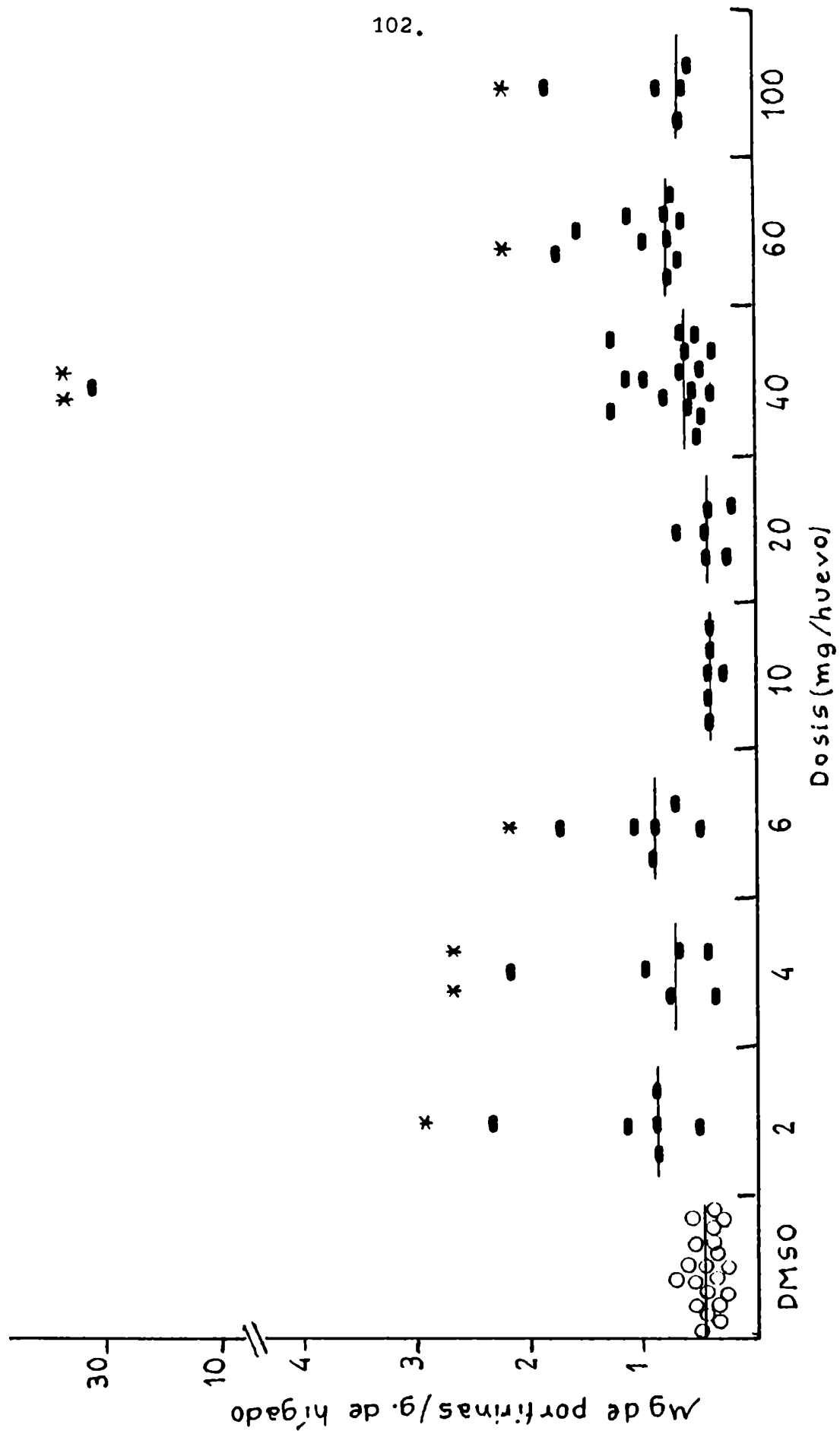


Figura 24: Efecto de diferentes dosis de malatión sobre el contenido hepático de porfirinas. Los otros detalles son como se indica en la Figura 18. Significativamente diferente del control de DMSO: *p < 0.002, **p < 0.05

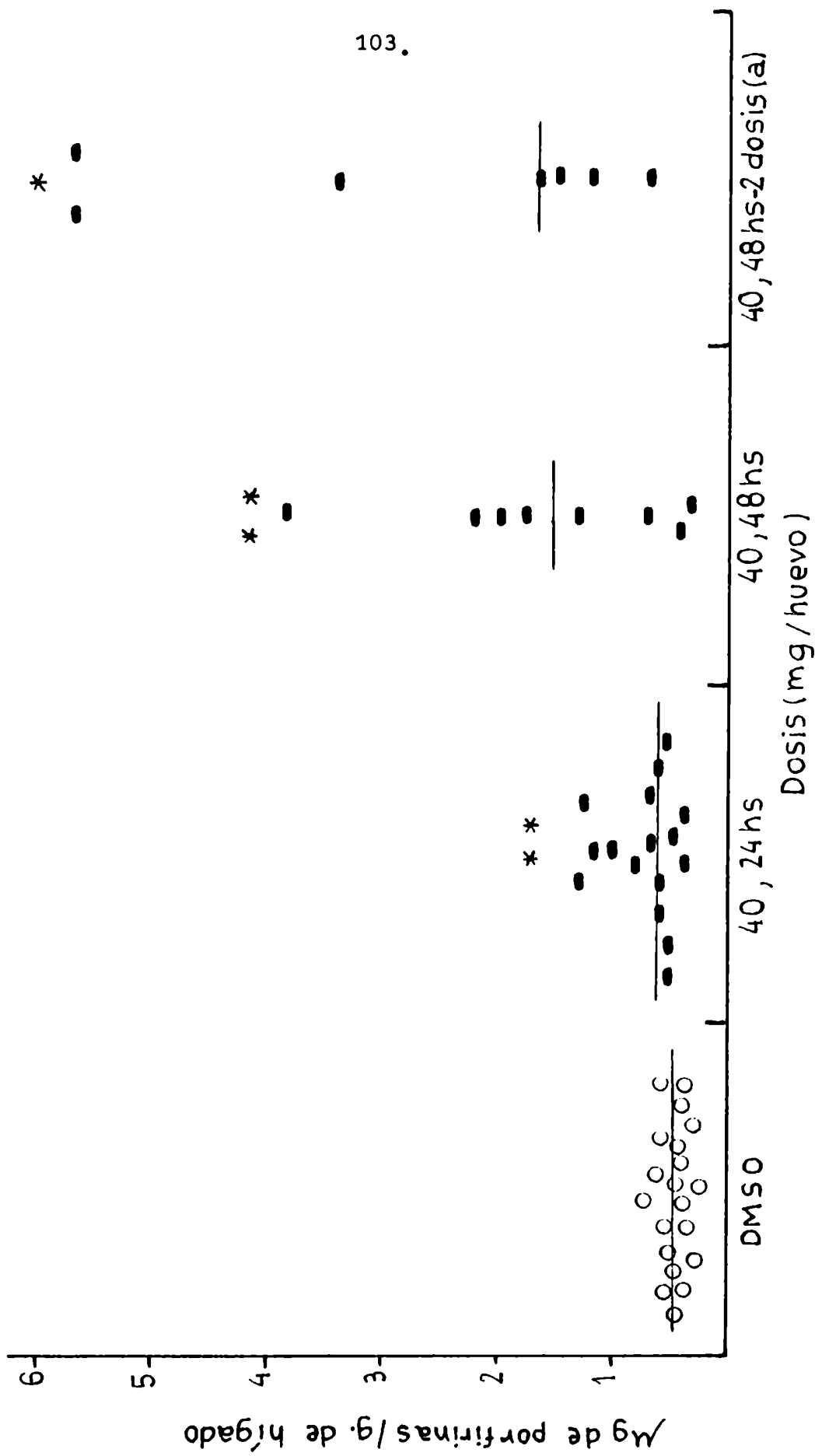


Figura 25: Acumulación hepática de porfirinas producida por malatión bajo diferentes condiciones. Se utilizó la dosis de 40 mg/ embrión. (a) La segunda dosis se dió 24 hs después de la primera. Los otros detalles son como se indica en la Figura 18. Significativamente diferente del control de DMSO: * $p < 0.002$, ** $p < 0.05$.

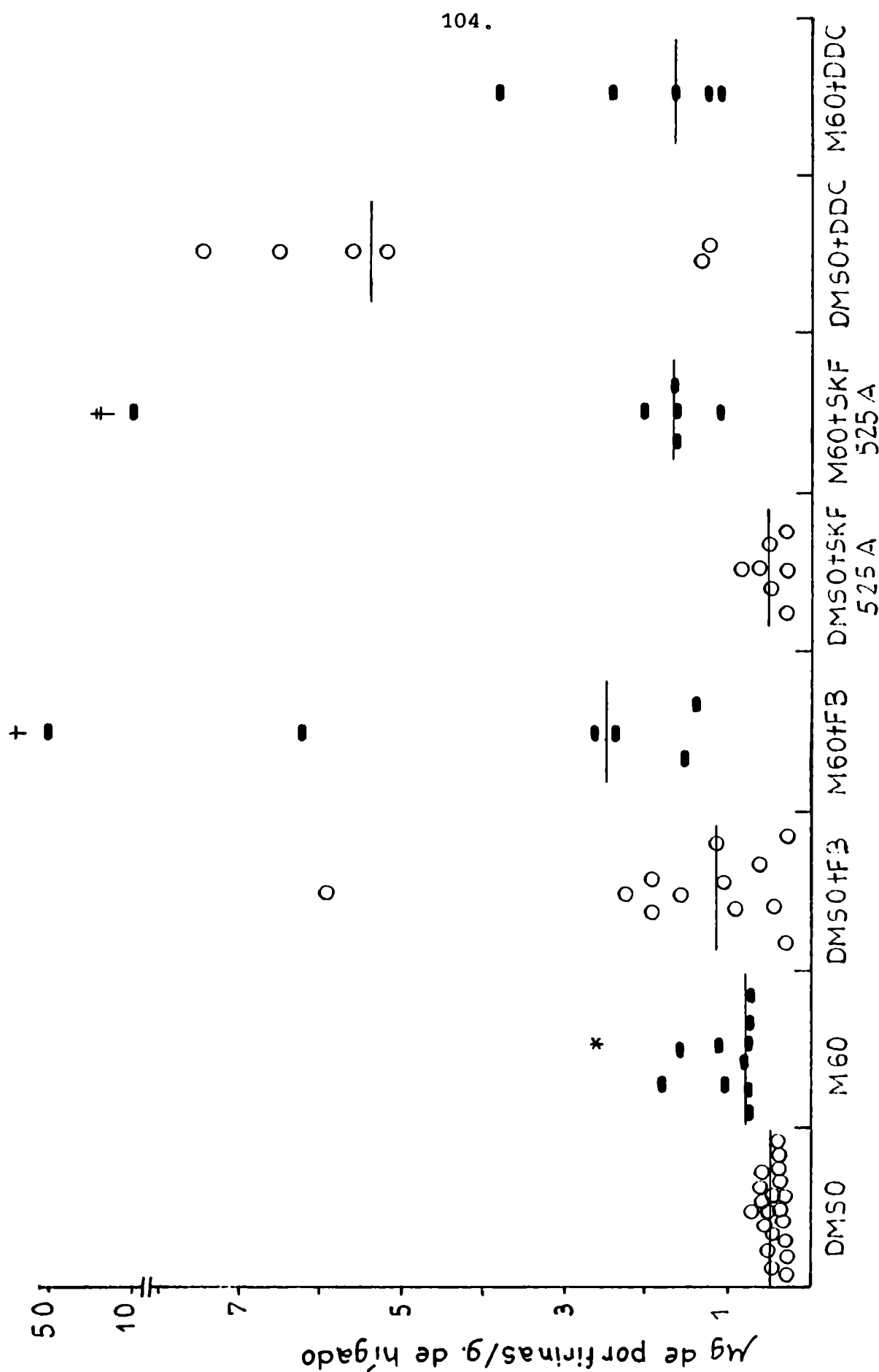


Figura 26: Efecto de FB, SKF 525A y DDC sobre la acumulación de porfirinas producida por malatión en la dosis de 60 mg/embrión (M60). Los otros detalles son como se indica en la Figura 18. *Significativamente diferente del control de DMSO: $p < 0.002$. †Significativamente diferente del control de DMSO + FB: $p \leq 0.01$. ‡ Significativamente diferente del control de DMSO + SKF 525A: $p \leq 0.002$.

respectivamente). Sin embargo, teniendo en cuenta la acción del FB "per se", no se encuentra un efecto sinérgico con la inyección conjunta de malatión y FB.

Tampoco el tratamiento con SKF 525A mejora la acumulación de porfirinas producida por esta droga, ya que los valores hallados para los controles con y sin SKF 525A son similares y lo mismo ocurre con los valores obtenidos para la droga sola y con SKF 525A.

Por último el tratamiento con la droga en presencia de DDC no aumentó la acumulación de porfirinas respecto al control (DMSO + DDC).

I - 2 . ACTIVIDAD DE ALA - S .

Esta actividad enzimática se ensayó en los hígados de los embriones de pollo de 17 días tratados con cada uno de los 4 pesticidas en estudio durante 5 horas. Los resultados se muestran en la Figura 27. No se encontraron diferencias significativas para el paratión (0,05 mg/huevo) ni el endosulfán (0,25 mg/huevo) con respecto al control de DMSO.

El malatión se utilizó en dosis de 40 y 60 mg/huevo. Ambas incrementaron significativamente la actividad de ALA-Sintetasa respecto al control. El incremento obtenido fue mayor con la mayor de las dosis. El valor medio obtenido en la menor dosis fue aproximadamente 4 veces el del control ($15,4 \pm 2,4$ frente a $3,9 \pm 0,7$ nmol

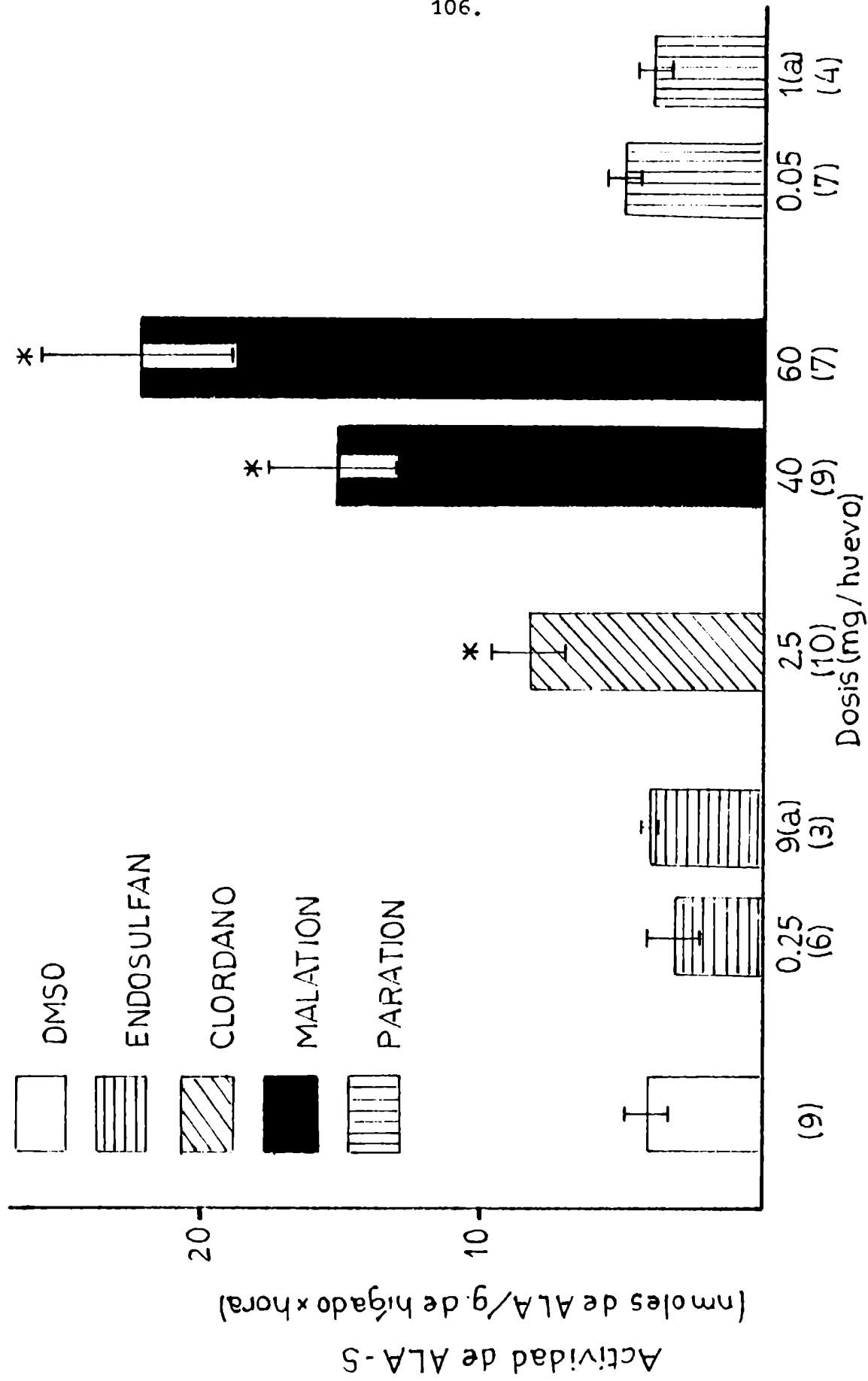


Figura 27: Efecto de los plaguicidas estudiados sobre la actividad de ALA-5 en embriones de pollo de 17 días. En cada caso la dosis ensayada aparece abajo del histograma y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones. Los embriones se incubaron a 38°C y se mataron 5 hs después. Los resultados se expresan como el valor medio \pm el error estándar. (a) 90 minutos de incubación en lugar de 5 hs. *Significativamente diferente del control de DMSO: $p < 0.05$.

ALA/g de hígado \times hora) y en la dosis de 60 mg fue unas 6 veces el del control ($22,6 \pm 3,5$ frente a $3,9 \pm 0,7$ nmol de ALA/g de hígado \times hora).

El clordano modificó significativamente esta actividad enzimática a nivel de $p = 0,05$ cuando se ensayó en la dosis de 2,5 mg/embrión. Pero en este caso el valor medio, obtenido es sólo unas 2 veces el del control.

Los plaguicidas que no alteraron la actividad de ALA-Sintetasa en las dosis previamente estudiadas fueron administrados en mayores dosis. Se utilizó 1 mg de paratión y 9 mg de endosulfán ya que como se ha visto estas dosis producen incrementos significativos del contenido de porfirinas en el hígado. En este caso los embriones se incubaron 90 minutos para asegurarse la supervivencia de los mismos. Como se ve en la Figura 27 tampoco se modificó la actividad de ALA-S bajo estas nuevas condiciones.

DISCUSION .

Como puede verse en los resultados obtenidos los 4 pesticidas estudiados afectan en diferente grado el camino biosintético del hemo y todos ellos producen aumento del contenido hepático de porfirinas.

Clordano y malatión incrementan no sólo los niveles hepáticos de porfirinas sino también la actividad de ALA-S, enzima primera y regulatoria de este camino biosintético y por lo tanto pueden ser consideradas drogas porfirinogénicas.

En el caso del malatión cabe señalar que el aumento en el contenido hepático de porfirinas al cabo de 24 horas no es muy grande pese a ser significativo. Pero se logra una mejor respuesta prolongando el tiempo de incubación con la droga a 48 horas y también dando una segunda inyección de la droga durante este período de 48 horas.

La acumulación de porfirinas provocada por el Clordano en el hígado de embrión de pollo informada en el presente trabajo, está de acuerdo con lo informado por De Matteis (263) quien encontró que este plaguicida es capaz de producir un incremento en la cantidad de porfirinas medida por fluorescencia en cultivo de hepatocitos de embrión de pollo.

Paratión y endosulfán promueven una notable acumulación de porfirinas pero no aumentan la actividad de ALA-S. Esto podría ex-

plicarse por una inhibición a nivel de Copro-O ó FQ porque cuando las porfirinas contenidas en el hígado de algunos de los embriones tratados con estos plaguicidas se esterificaron y separaron cromatográficamente de acuerdo al método de Doss (302) se encontraron notables cantidades de Copro y Proto pero no se observó en ningún caso acumulación de uroporfirina.

En cuanto a la falta de efecto del endosulfán sobre la actividad de ALA-S, estos resultados han sido posteriormente confirmados. En un trabajo aparecido durante el año 1985, Narayan y Misra (303) encontraron que la administración intratraqueal de endosulfán a ratas no tiene efecto sobre la actividad de ALA-S de hígado.

Por otro lado, si se analiza el comportamiento de los plaguicidas ensayados frente a FB, SKF 525A y DDC, se ve respecto al primero de ellos que tiene un efecto semejante sobre la acumulación de porfirinas provocada por clordano, endosulfán y paratión. En todos estos casos se obtiene una respuesta similar en presencia y ausencia de FB; si bien la diferencia con FB es un poco menor y no significativa a nivel de $p \leq 0.05$ teniendo en cuenta que el control con FB (DMSO + FB) es algo superior al control de DMSO debido a un efecto de la droga "per se". Es decir, que en ninguno de estos casos el FB mejora la respuesta de las drogas.

Los resultados hallados en el tratamiento conjunto con Fenobarbital y Malatión son semejantes aunque en este caso tanto el incremento producido por la droga sola (M60) frente al control de DMSO como el producido por la droga en presencia de FB (M60 + FB)

respecto a su control (DMSO + FB) son estadísticamente significativos.

Por lo tanto en ninguno de los casos estudiados el FB estimuló la acumulación de porfirinas producida por los plaguicidas. Esto indicaría que estos no actúan a través de un metabolito, o más estrictamente, considerando que existen varias isoenzimas del citocromo P 450 como se ha señalado en la Introducción (Sección III-1) y sólo algunas de ellas son inducibles por fenobarbital, estas isoenzimas no parecen participar en la formación de un metabolito activo a partir de estos plaguicidas.

Tampoco el SKF 525A parecería tener efecto sobre la acción de estas drogas a nivel del contenido hepático de porfirinas. Esto podría tener más de una explicación. Por un lado, existen informes en bibliografía según los cuales el SKF 525A no tendría una acción inhibitoria general (304) sobre el sistema metabolizante de drogas. Este inhibiría algunas enzimas específicas y sólo, por ende, afectaría la metabolización de aquéllas sustancias que utilizan dichas enzimas, lo cual podría justificar la falta de efecto sobre las drogas ensayadas.

Por otro lado, se ha informado que el SKF 525A inhibe las isoenzimas del citocromo P 450 inducibles por FB (305). Desde este punto de vista los resultados hallados con este inhibidor así como los encontrados con FB mostrarían que estas isoenzimas del citocromo P 450 no participan en la metabolización de estas drogas, ya que tanto el aumento como la disminución de las isoenzimas induci-

bles por FB no afectan la respuesta de los plaguicidas

En cuanto al DDC el bloqueo producido por éste sobre la actividad de FQ, con la consecuente disminución en la formación de hemo y hemoproteínas, no incrementó la acumulación de porfirinas debido a los plaguicidas si se tiene en cuenta el considerable aumento, producido por el DDC solo. Este aumento es mayor al informado por Anderson (274) trabajando en condiciones semejantes pero con embriones White Leghorn. O sea que no estaría disminuida la a acumulación de porfirinas debida a los plaguicidas como consecuencia de su pasaje a hemo o hemoproteínas. Esto podría sugerir la inhibición de alguna enzima como FQ o Copro-O por estos plaguicidas. La inhibición no sería a nivel de PCL ya que con ninguno de los cuatro se observó acumulación de Uro al analizar la naturaleza de las porfirinas presentes en el hígado. Esto ya se ha señalado para el caso del endosulfán y paratión. Además, como se verá más adelante el malatión disminuye parcialmente la actividad de FQ.

Los resultados de esta investigación muestran que tanto los compuestos organoclorados como los organofosforados afectan el metabolismo del hemo.

La capacidad de los plaguicidas organofosforados estudiados de inducir acumulación de porfirinas está de acuerdo con los resultados de Koeman y colaboradores (306) quienes investigaron el potencial porfirinogénico de algunos compuestos organofosforados distintos de los estudiados aquí. Ellos informaron que en cultivo de hepatocitos de pollo clorfenvinfos, abate y metilazinfos son

capaces de aumentar el contenido de porfirinas después de la inducción con fenobarbital o β -naftoflavona, pero clorfenvinfos también produce este incremento sin inducción.

II - EVALUACION DE LA CAPACIDAD
PORFIRINOGENICA DEL LINDANO
EN RATAS.

RESULTADOS .

II - 1. EFECTO DEL LINDANO SOBRE LA EX- CRECION DE PORFIRINAS Y PRECUR- SORES .

II - 1a. Excreción de ALA y PBG en orina .

ALA y PBG son el primero y segundo intermediario del camino metabólico del hemo respectivamente, de allí que pueda verse afectada su excreción al producirse fallas en este camino. Estos compuestos solubles en agua se eliminan por orina.

Cuando se trataron ratas con lindano y se estudió semanalmente la excreción urinaria de ALA (Figura 28) se encontraron valores algo incrementados de este metabolito. Estos aumentos no permanecieron constantes a lo largo del tratamiento sino que hubo picos de excreción, es decir que para cada rata tratada algunos valores hallados se encontraron dentro del rango normal y otros por encima de él.

Cuando se estudió la excreción del segundo intermediario del camino PBG (Figura 29) también se encontró aumento de la cantidad excretada en las ratas tratadas con el plaguicida, aunque en este caso fueron aún menos las determinaciones que cayeron dentro del rango normal; es decir que el aumento fue más consistente.

Cabe señalar que tanto para ALA como PBG no se encontró

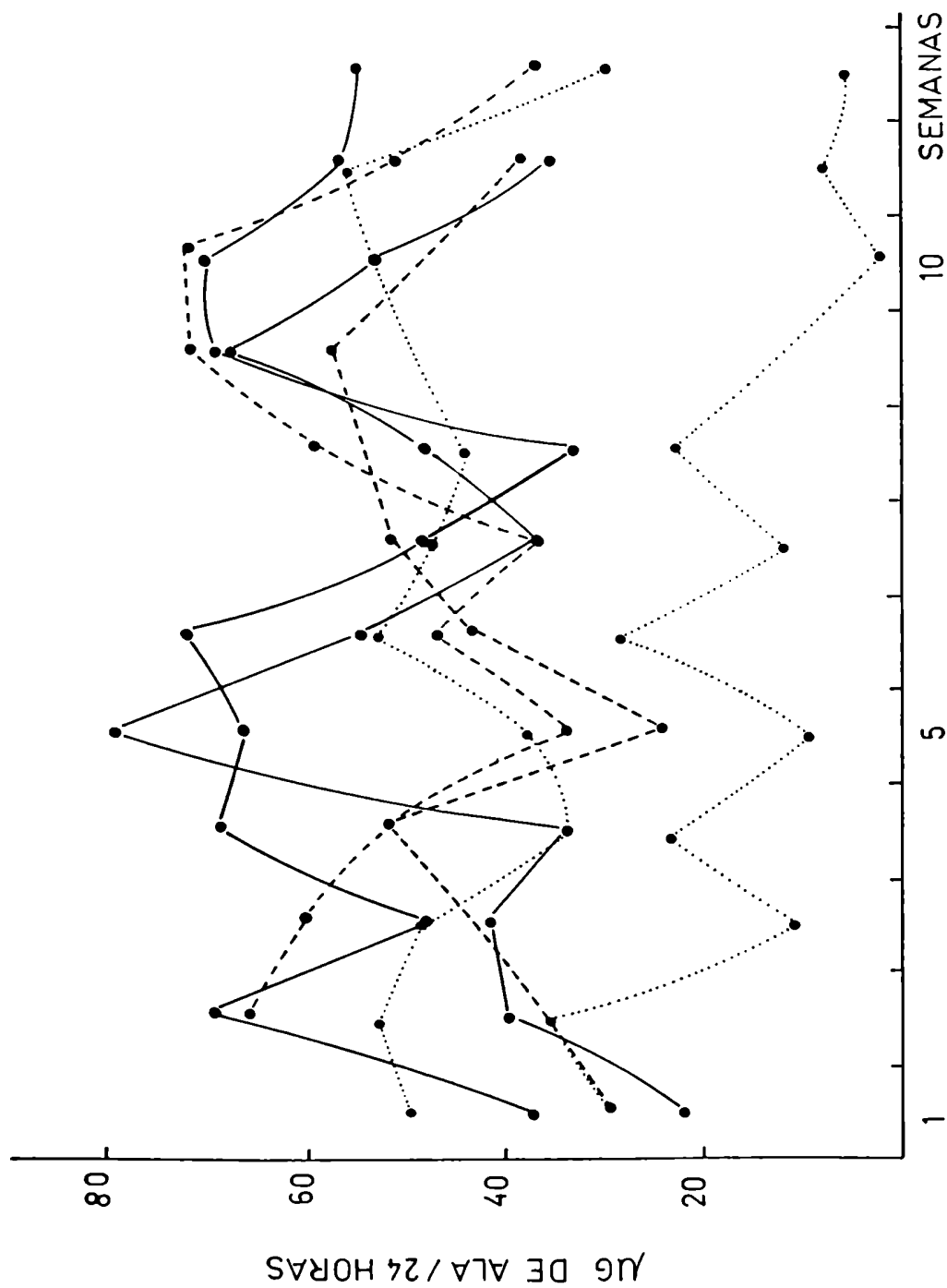


Figura 28: Efecto del lindano sobre la excreción urinaria de ALA en ratas. Para los lotes tratados con lindano en aceite (—) y lindano en tween (---) cada punto representa la excreción urinaria individual de ratas características de cada lote. Para el lote normal (.....) se representa el rango dado por la mayor y menor excreción de ALA obtenida cada semana dentro de este lote.

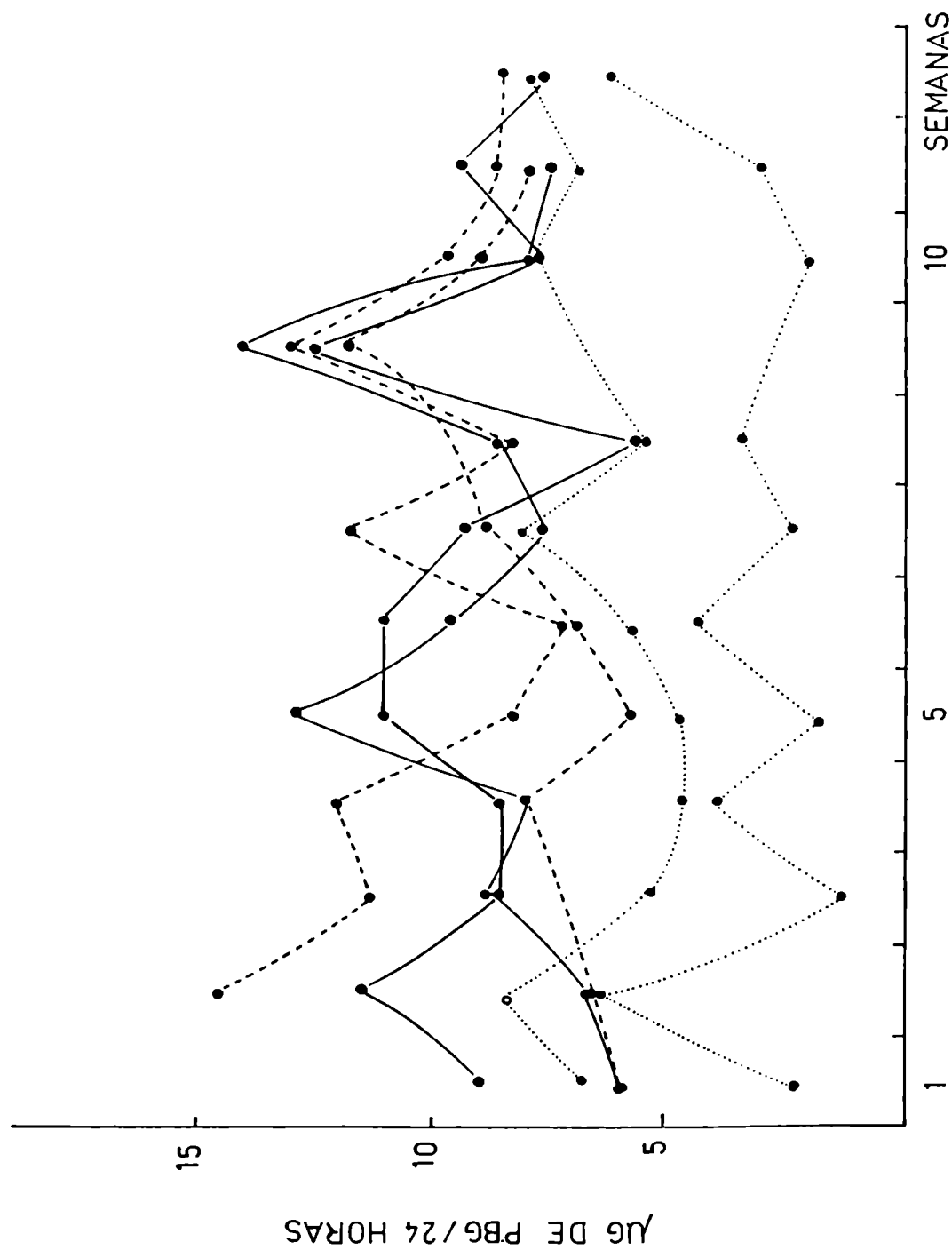


Figura 29: Efecto del lindano sobre la excreción urinaria de PBG en ratas. Lindano en aceite (- -)
 lindano en tween (—); rango normal (.....). Los otros detalles son como se describe en la Figura
 28.

una diferencia notable en el tratamiento con tween y con aceite ya que las curvas correspondientes a estos tratamientos se entrecruzaron a lo largo del tiempo estudiado.

II - 1b. Excreción de porfirinas en orina.

Se estudió el contenido de porfirinas en orina (Figura 30) habiendose hallado incrementos desde el comienzo del tratamiento de las ratas con lindano. Casi todas las determinaciones en las ratas tratadas se encontraron fuera del rango normal. La magnitud de estos incrementos fue mayor que para el caso de los precursores ALA y PBG llegándose a encontrar valores que son alrededor de 4 veces superiores a los máximos hallados en las determinaciones controles.

En este caso parecería haber una respuesta mayor y más temprana en el tratamiento con tween pero luego tiende a asemejarse a la del tratamiento con aceite.

II - 1c. Excreción de Copro y Proto en heces.

La excreción fecal de Copro en las ratas tratadas con lindano se encuentra aumentada respecto a los controles (Figura 31).

Esto ya se ve en el lote con tween al comienzo del tratamiento donde apareció en una de las ratas un pico prominente (126 μ g de Copro/ 24hs) en la tercera semana y esta misma rata produjo una

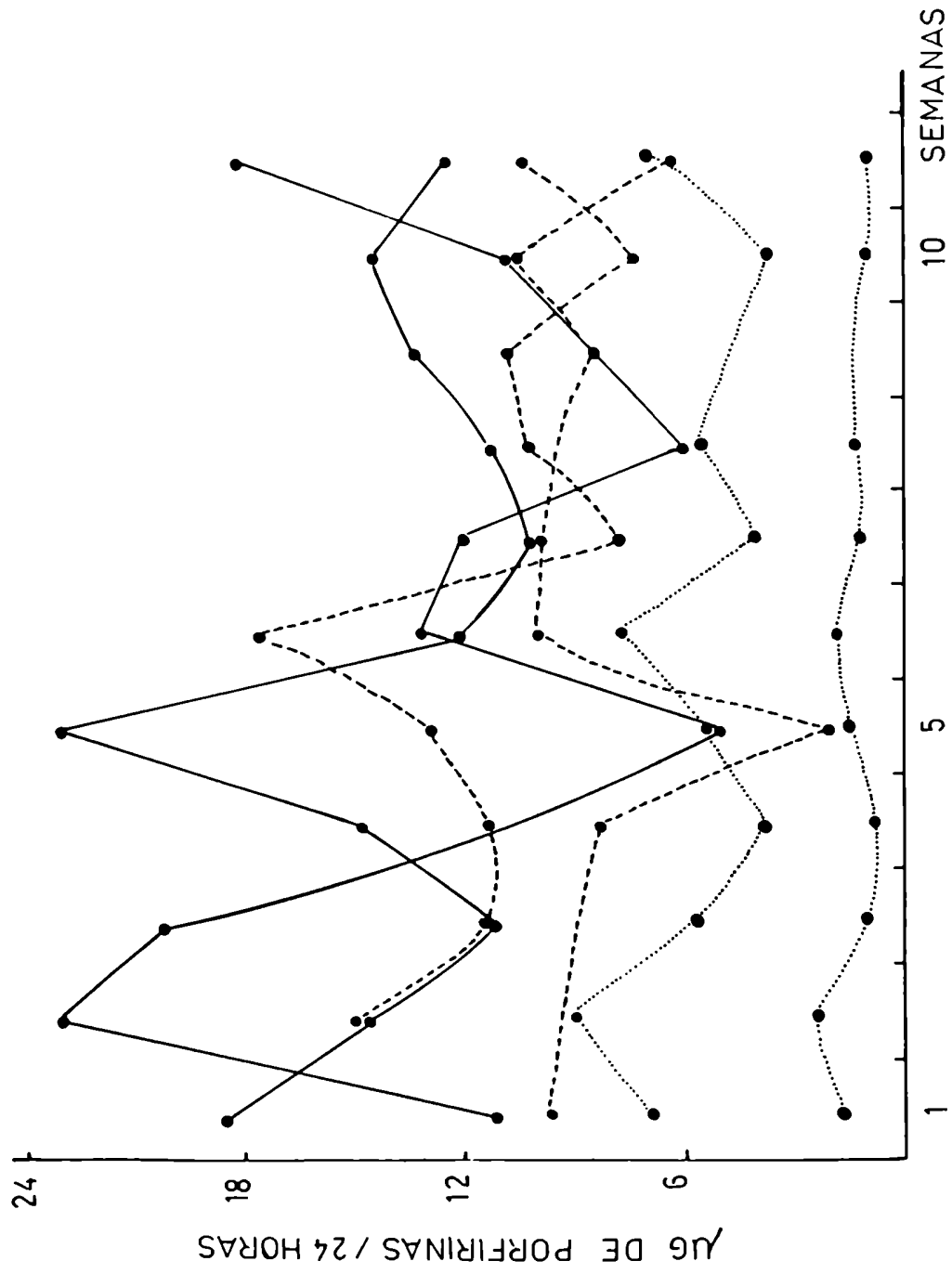


Figura 30: Efecto del lindano sobre la excreción urinaria de porfirinas en ratas. Lindano en aceite (- - -); lindano en tween (—); rango normal (.....). Los otros detalles son como se describe en la Figura 28.

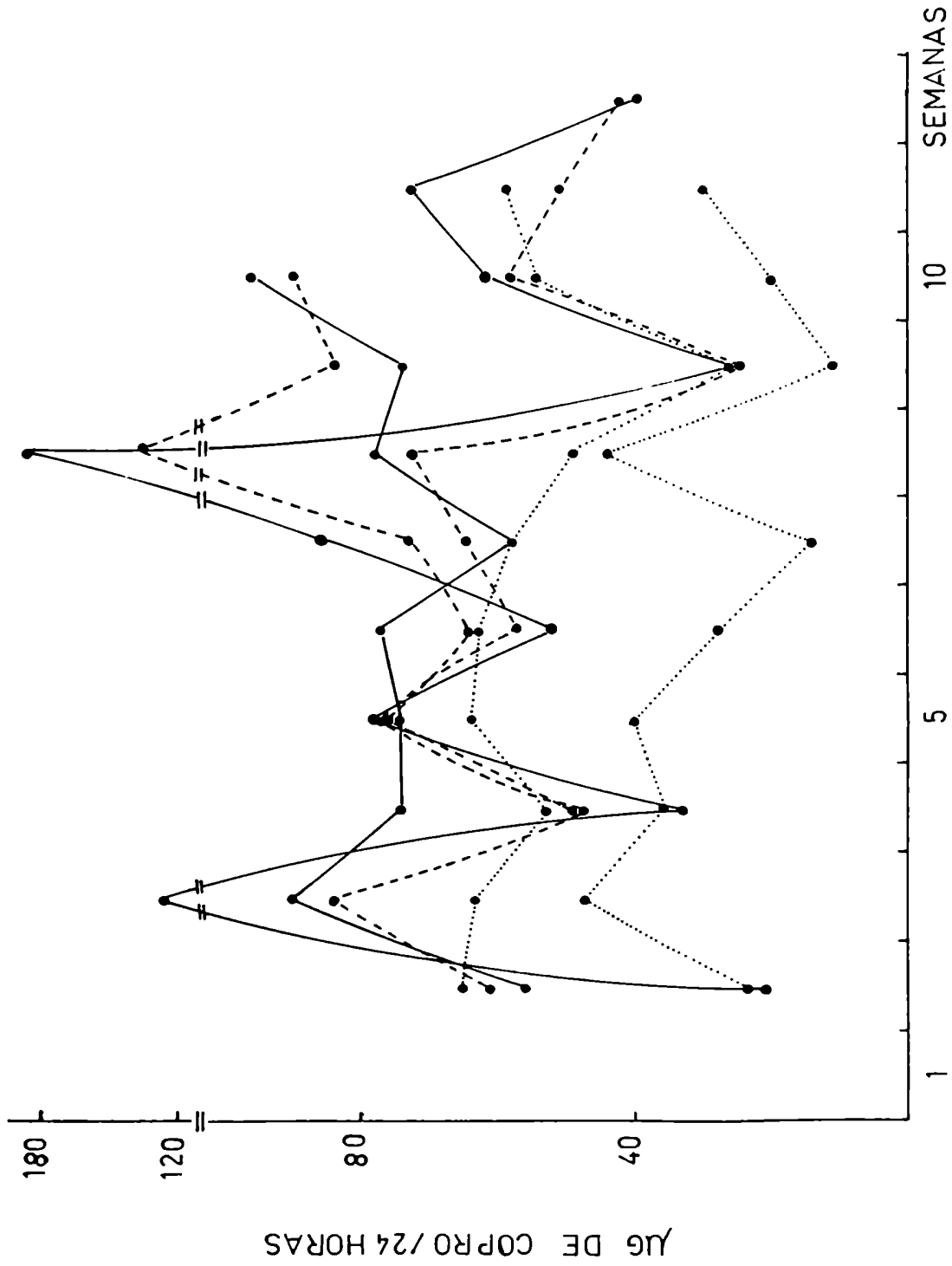


Figura 31: Efecto del lindano sobre la excreción fecal de Copro en ratas. Lindano en aceite (---); Lindano en tween (—); rango normal (.....). Los otros detalles son como se describe en la Figura 28.

excreción de 187 μ g de Copro/24 hs en la octava semana mientras que los valores normales no superaron en ningún caso los 65 μ g de Copro/24 hs. Aparecieron además en este lote varios valores elevados del orden de 90 μ g Copro/24 hs. En el tratamiento con lindano disuelto en aceite también hubo incremento de la eliminación de Copro en heces. En este caso se halló en una de las ratas un pico prominente de excreción (135 μ g de Copro/24 hs) durante la octava semana.

La excreción de Proto se ve incrementada tanto en el tratamiento con tween como con aceite (Figura 32). En el segundo caso las curvas que se obtuvieron estaban menos entrelazadas con el rango normal. Hubo varias determinaciones que superaron los 200 μ g de Proto/24 hs mientras sólo algunos valores normales máximos alcanzaron los 150 μ g de Proto/24 hs y la mayoría de los valores oscilaron alrededor de 100 μ g de Proto/24 hs encontrándose valores desde 40 μ g de Proto/24 hs.

En el lote con tween algunas determinaciones alcanzaron los 200 μ g de Proto/24 hs; llegándose a obtener en una de las ratas durante la octava semana un valor de 477 μ g de Proto/24 hs.

II - 2. EFECTO DEL LINDANO SOBRE LA ACTIVIDAD HEPATICA DE ALA-S Y PCL.

Al cabo de las 12 semanas de tratamiento con lindano se mataron los animales, se extrajeron los hígados y se determinaron las

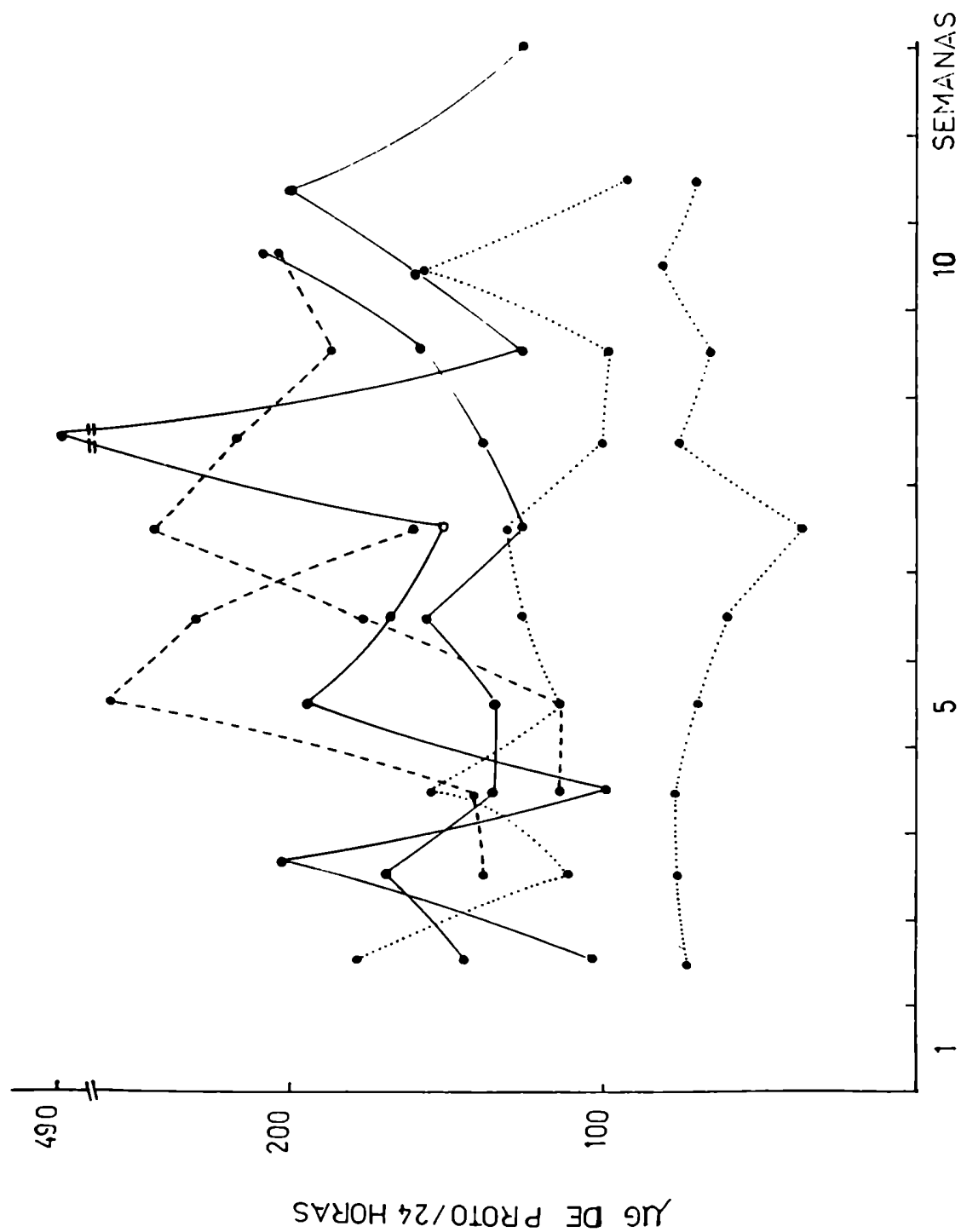


Figura 32: Efecto del lindano sobre la excreción fecal de Proto en ratas. Lindano en aceite(---) lindano en tween (—); rango normal (.....). Los otros detalles son como se describe en la Figura 28

actividades enzimáticas de ALA-S y PCL.

Dado que no se encontraron diferencias notables en las excreciones así como tampoco en las actividades enzimáticas entre los 2 lotes tratados con lindano (el de tween y el de aceite); ambos lotes se agruparon para el análisis de ALA-S y PCL de modo que se analiza el lote control contra el tratado con lindano para ver el efecto de esta droga sobre ambas enzimas. No se encontró una diferencia significativa en la actividad de ALA-S entre el lote normal y el tratado al nivel de $p \leq 0.05$ cuando se realizó el test no paramétrico de Wilcoxon (Figura 33).

En cuanto a la actividad de PCL (Figura 34) tanto en la 1ra. etapa que involucra la formación de hepta - + hexa - + penta - + copro-porfirina, como en la 2a. etapa que mide la formación de coproporfirina; los valores hallados en los animales tratados no difieren significativamente de los controles cuando se realiza el test estadístico.

Cabe señalar que este palguicida no provocó la aparición de fluorescencia bajo la luz ultravioleta en los hígados de los animales y, por otro lado, cuando en algunas de las ratas se analizó el contenido hepático de porfirinas no se encontraron diferencias significativas entre los animales normales y los tratados.

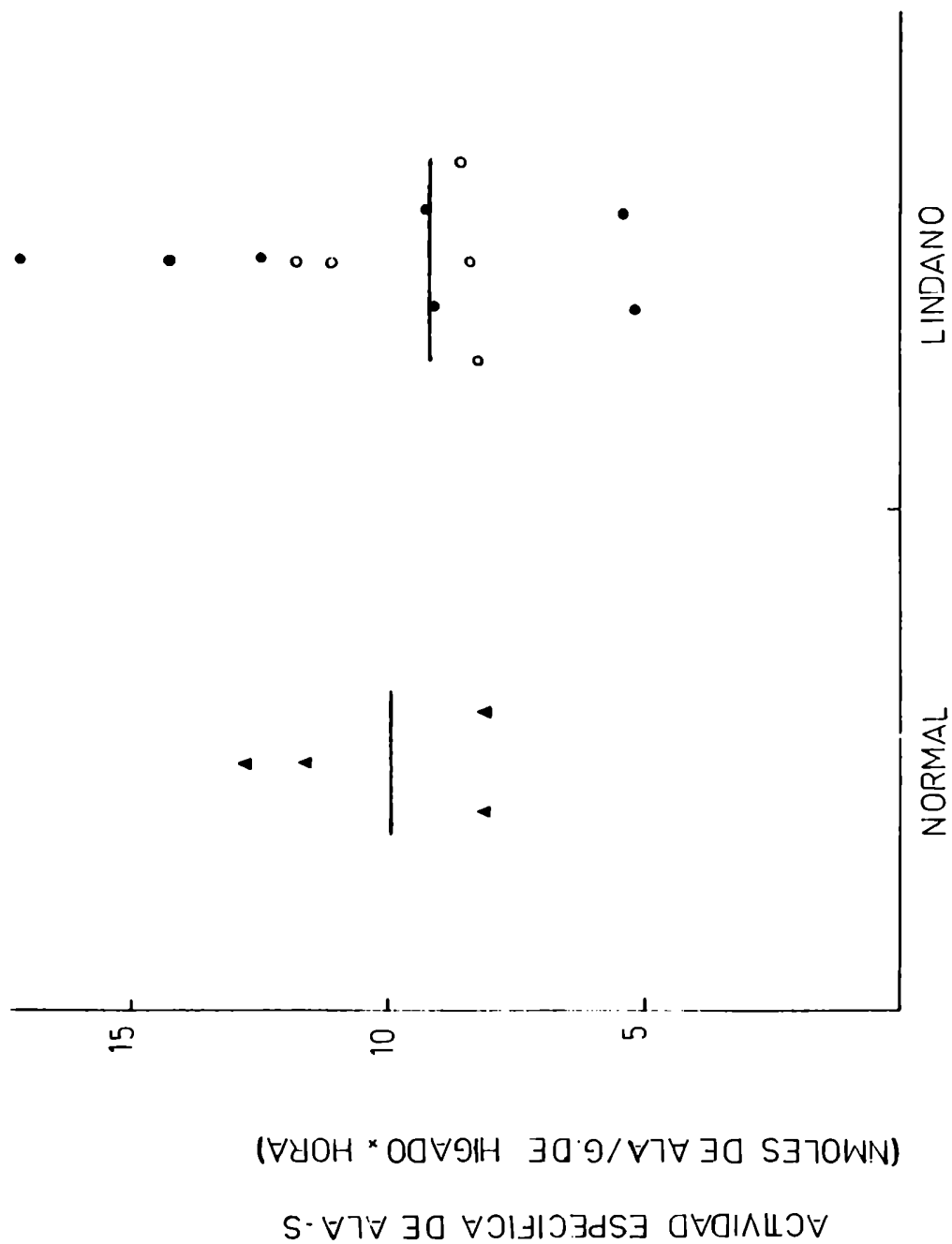


Figura 33: Efecto del lindano sobre la actividad hepática de ALA-Sintetasa (ALA-S). Se grafican los valores obtenidos para el lote normal (▲) y el tratado con lindano en tween (●) y lindano en aceite (○). Se representa la mediana por (—).

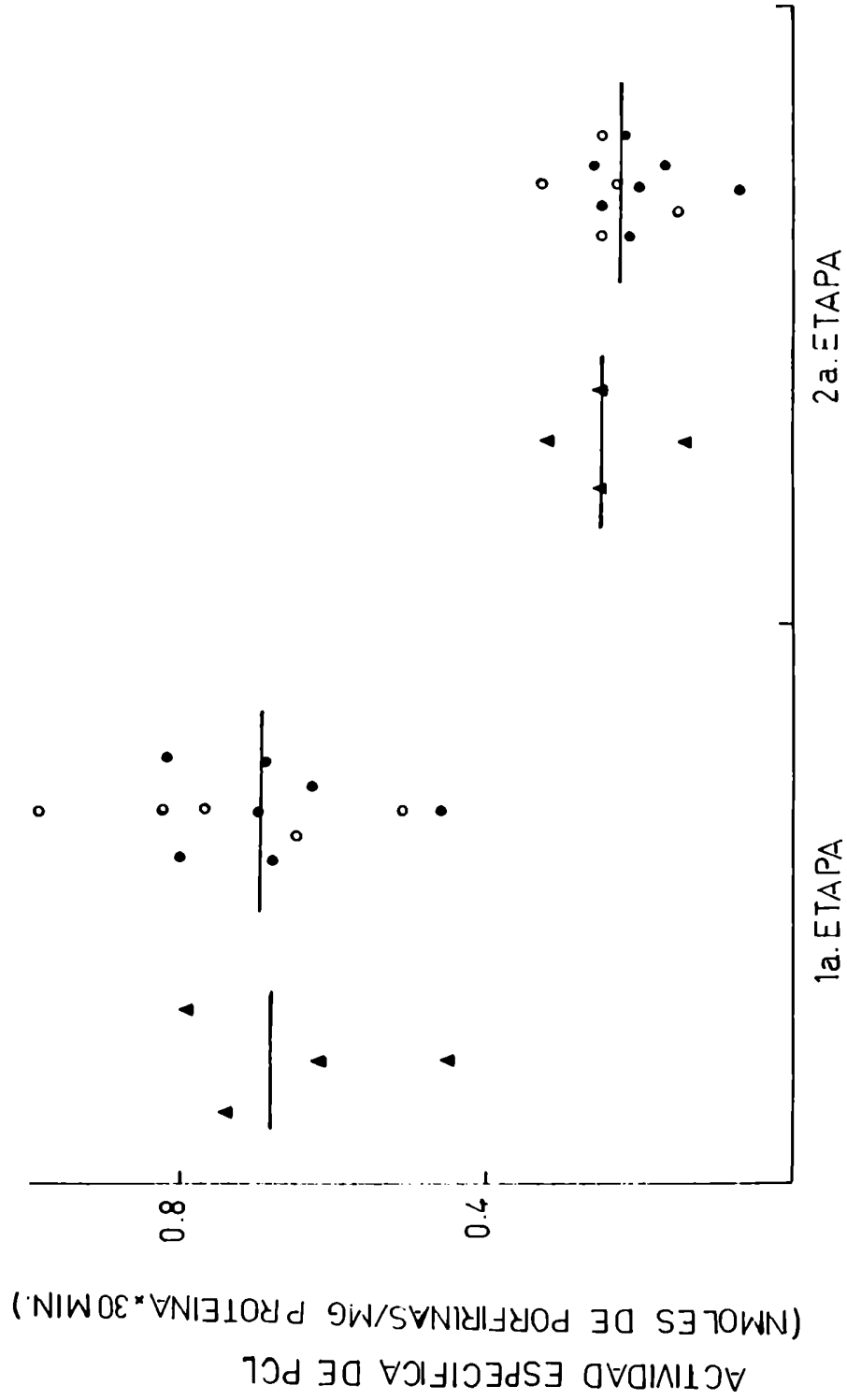


Figura 34: Efecto del lindano sobre la actividad hepática de porfirinógeno carboxilasa (PCL). Se grafican los valores obtenidos para la 1a. y 2a. etapa para el lote normal (▲) y el tratado con lindano en tween (●) y lindano en aceite (○). Se representa la mediana por (—).

DISCUSION .

El lindano aumentó la excreción de ALA, PBG y porfirinas en orina y porfirinas en heces al ser inyectado tanto con tween como con aceite.

Los aumentos en la excreción de porfirinas confirman los resultados obtenidos por Simon y Siklósi (307) trabajando con ratas macho pero estos autores no detectan aumentos en la excreción urinaria de ALA y PBG.

Por un lado, existen informes en literatura sobre el incremento de porfirinas producido por lindano en cultivo de hepatocitos de embrión de pollo (263) que fueron identificadas como uroporfirina (253) lo que sugeriría una disminución de la actividad de PCL.

Por otro lado, Taira y Viale (264) trabajando con embriones de pollo de la cepa New Hampshire "in ovo" encuentran acumulación hepática de porfirinas y disminución de la actividad de PCL cuando pretratan los animales con fenobarbital pero no se afecta esta actividad enzimática con la droga sola.

En nuestro caso tampoco encontramos afectada la actividad de PCL y esto es concordante con el aumento de la excreción de Copro en heces y también en orina si se tiene en cuenta que la absorbancia máxima de las porfirinas urinarias corresponde a la longitud de onda de la Copro (401 nm).

La enzima primera y regulatoria de este camino, ALA-S no se

incrementó durante el tratamiento con lindano confirmando lo observado por Simon y Siklósi (307) lo que sugeriría que estas alteraciones no afectarían el "pool" regulatorio de hemo.

El aumento en la excreción de Copro en orina y heces, así como el incremento de Proto en heces podría deberse a una falla en la conversión de Proto en hemo lo que implicaría una acumulación de Proto; la cual a su vez podría causar una acumulación de Copro como proponen Kreimer y Grinstein (308).

El aumento de la excreción de varios de los intermediarios de este camino también podría ser interpretado de acuerdo a la teoría de Kószó y colab. (309) según la cual los compuestos lipofílicos como el lindano y HCB, siendo este último el más estudiado desde este punto de vista, alterarían la permeabilidad de la membrana. Este es un factor importante en este camino metabólico ya que algunas de las reacciones ocurren dentro de la mitocondria y otras en el citoplasma. Como consecuencia de estas fallas en la permeabilidad los precursores penetrarían en el espacio intersticial y finalmente se eliminarían en su circulación a través de los riñones. Estas fallas en la permeabilidad justificarían una mayor pérdida de intermediarios.

Cabe señalar que el HCB produce una respuesta distinta a la del lindano pese a estar químicamente relacionado con éste y a formar varios metabolitos comunes.

El aumento de precursores y porfirinas (especialmente uroporfirina) en orina es mayor y más constante en el tiempo que el ha-

llado con lindano. Además, la actividad de ALA-S está aumentada mientras que la actividad de PCL está disminuida (238, 240, 241). Esto último produce un notable aumento de uroporfirina tanto en el hígado como en la orina. Esta acumulación de porfirinas en el hígado provoca una gran fluorescencia en este tejido. El lindano, en cambio, produce un aumento de porfirinas bastante menor y cualitativamente distinto y se manifiesta en la excreta sin llegar a provocar acumulación en el hígado.

Estudios con ratas han demostrado que inductores del sistema metabolizante de drogas como fenobarbital y β -naftoflavona incrementan la acción porfirinogénica del HCB (241, 310, 311) lo que indica que dicha acción está mediada por metabolito.

Existen metabolitos comunes entre HCB y lindano como son los penta, tetra y triclorofenoles siendo además el HCB un metabolito del lindano, pero el lindano sufre una pequeña metabolización en ratas lo que produciría bajos niveles de estos metabolitos (312, 313).

Por otro lado el metabolito responsable del efecto del HCB parecería ser anterior a la formación de sus pentacloroderivados ya que estos no tienen efecto en ratas (252). Por lo tanto la formación del metabolito activo, que se produciría a partir del compuesto aromático de 6 cloros antes de la pérdida del primer cloro para dar los pentacloroderivados, sería poco importante, si la hubiera, con el lindano ya que los principales metabolitos aromáticos del lindano tienen 5, 4 y 3 cloros. Esto podría justificar su respuesta distinta.

III - ESTUDIOS SOBRE EL AUMENTO
DE ALA-S PRODUCIDO POR
MALATION.

RESULTADOS.

III - 1. Efecto de la variación del tiempo de tratamiento de los embriones con malatión sobre la actividad de ALA-S.

Como ya se ha señalado el malatión produce un importante aumento de la actividad hepática de ALA-S en embriones de pollo de 17 días de la raza New Hampshire. Se utilizan en esta parte del trabajo embriones de 18-19 días que presentan un incremento algo mayor de esta actividad enzimática.

Se quiso estudiar la evolución de este incremento en función del tiempo de tratamiento con este plaguicida.

Para ello se inyectaron los embriones con la droga y al cabo de distintos tiempos se mataron los animales y se determinó la actividad de ALA-S en el hígado.

Como puede verse en la Tabla 2 ya se encuentra un incremento de esta actividad enzimática luego de 2,5 horas de incubación con la droga; y al prolongar este período de incubación el incremento es cada vez mayor.

A partir de estos resultados y por razones de conveniencia experimental en general, se incubaron los embriones con la droga entre 3 y 4 horas.

TABLA 2: VARIACION DE LA ACTIVIDAD DE ALA-S EN FUNCION DEL TIEMPO DE TRATAMIENTO DE LOS EMBRIONES CON MALATION.

| Tiempo (horas) | Actividad de ALA-S (nmoles de ALA/g.híg. x 40 min.) |
|-------------------|--|
| 0 | 3.4 ± 0.6 (4) |
| 2.5 | 18.7 ± 2.3 (6) |
| 3.5 | 33.8 ± 3.9 (5) |
| 7 | 60 ± 13 (5) |
| 9 | 88 ± 18 (6) |

En cada caso los números entre paréntesis indican la cantidad de determinaciones realizadas. Se presenta el promedio \pm el error estandar. La actividad de ALA-S en los embriones se midió por el método de Marver como se indica en Métodos.

III - 2. Efecto de la variación del tiempo de incubación de la reacción enzimática sobre la formación de ALA.

También se midió la formación de ALA en función del tiempo de incubación de la reacción enzimática utilizando homogenato de hígado de embriones tratados con malatión. Como se muestra en la Figura 35 se vió que la velocidad de formación de ALA se mantiene prácticamente constante al prolongar el tiempo de incubación de la reacción hasta 60 minutos y luego comienza a decrecer.

Teniendo en cuenta estos resultados para determinar actividad de ALA-S los ensayos se incubaron durante 40 ó 60 minutos según se indica en cada caso. Es decir, dentro de la zona de velocidad constante de formación de ALA se eligieron para trabajar tiempos que permiten una apreciable formación de producto.

III - 3. Efecto de los inhibidores de la síntesis proteica sobre el aumento de ALA-S producido por malatión.

Se estudió el efecto sobre el aumento de ALA-S producido por malatión de un inhibidor de la síntesis proteica a nivel de traducción: la cicloheximida y un inhibidor a nivel de transcripción: la actinomicina D.

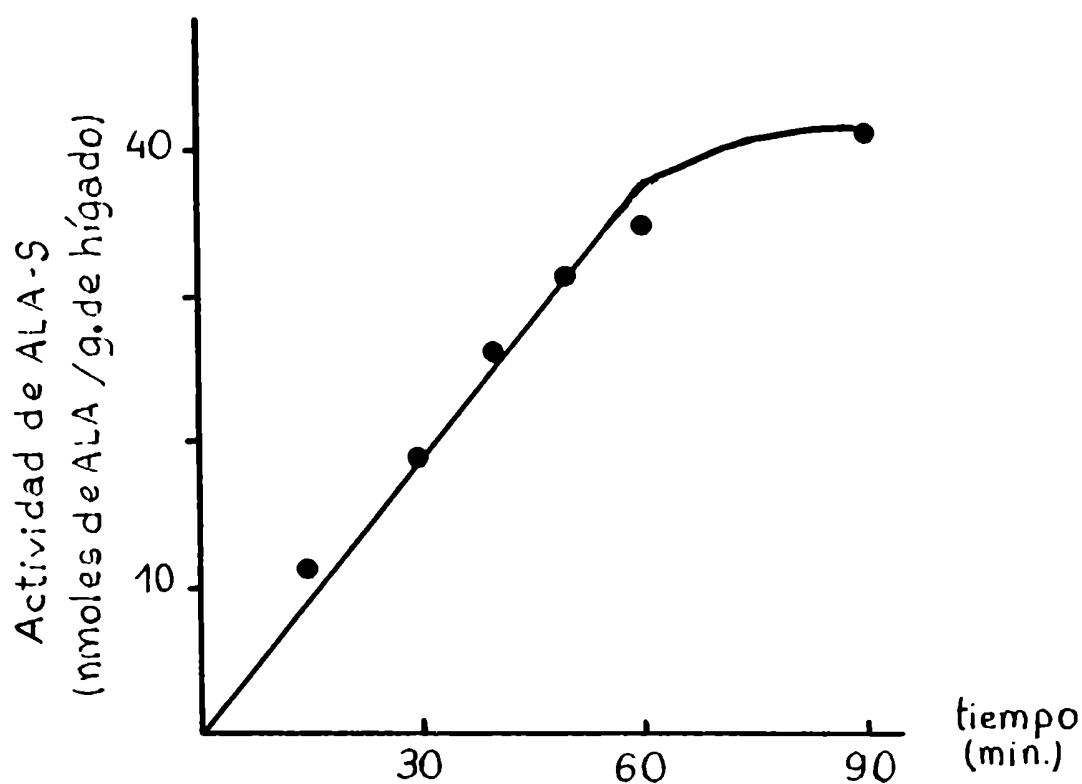


Figura 35: Curva de tiempo para la formación de ALA. El homogenato de hígado de embriones tratados con malatión se incubó durante los tiempos que se indica en cada caso y luego se midió la actividad de ALA-S por el método de Marver como se indica en Métodos.

III - 3a. Efecto de cicloheximida
sobre el aumento de ALA-S
producido por malatión.

Primero se investigó el efecto de la cicloheximida cuando ésta se encontraba presente desde el comienzo del tratamiento de los embriones con malatión. Así se inyectaron los embriones con este inhibidor (10 µg) y una hora después se administró el plaguicida. Al cabo de 3.5 horas de esta segunda inyección se mataron los embriones y se determinó la actividad de ALA-S.

Como control y para asegurarse que la dosis de cicloheximida era efectiva se inyectó un embrión con AIA y otro con AIA y cicloheximida.

Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 3. Se puede observar que esta dosis de cicloheximida produjo inhibición del incremento de ALA-S producido por AIA y también por malatión, si bien en este último caso el efecto parece algo menor.

Se decidió repetir el experimento pero esta vez se dió una segunda dosis del inhibidor una hora después de inyectado el plaguicida.

Cuando se inyectó esta segunda dosis de cicloheximida se logró una mayor inhibición del aumento de ALA-S corroborando de este modo, el efecto de este inhibidor (Tabla 3).

A continuación se realizaron otros experimentos en los cuales se trataron los embriones con malatión durante 3,5 horas; al cabo

TABLA 3: EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE CICLOHEXIMIDA SOBRE EL AUMENTO DE ALA-S
PRODUCIDO POR AIA Y MALATION.

| Tratamiento | Actividad de ALA - S (nmoles de ALA/g.híg. x 40 min.) |
|------------------------------------|--|
| AIA | 66.7 |
| AIA + Cicloheximida | 9.5 |
| Malatión | 33.8 ± 3.9 |
| Malatión + Cicloheximida (1 dosis) | 14.9 ± 2.9 * |
| Malatión + Cicloheximida (2 dosis) | 5.9 ± 0.9 ** |

En cada uno de los tratamientos con malatión se presenta el promedio de 5 determinaciones ± el error estándar. Significativamente diferente de malatión:

- * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

de este tiempo se inyectó cicloheximida y se midió la disminución de actividad con el tiempo. De este modo se determinó una vida media de 105 minutos para la enzima resultante del tratamiento de los embriones con el plaguicida (Figura 36).

Se hizo lo mismo en embriones tratados con AIA. En este caso la respuesta fue algo distinta ya que inicialmente (al cabo de una hora de inyectado el inhibidor) hay una pequeña disminución de actividad y luego la enzima decae exponencialmente con una vida media de 78 minutos (Figura 37).

III - 3b. Efecto de Actinomicina D sobre el aumento de ALA-S producido por malatión.

Con el fin de evaluar la acción de la Actinomicina D sobre el aumento de ALA-S producido por el plaguicida en estudio primero se investigó el efecto de una inyección simultánea de ambas drogas. Es decir que los embriones se trataron con las dos drogas y al cabo de 3,5 horas se mataron y se determinó la actividad enzimática en el hígado.

Como puede verse en la Tabla 4 el tratamiento desde un comienzo con este inhibidor bloquea el aumento de ALA-S producido por el plaguicida.

Los resultados sugerirían, en principio, que se requiere síntesis del RNA mensajero de ALA-S para que haya aumento de actividad.

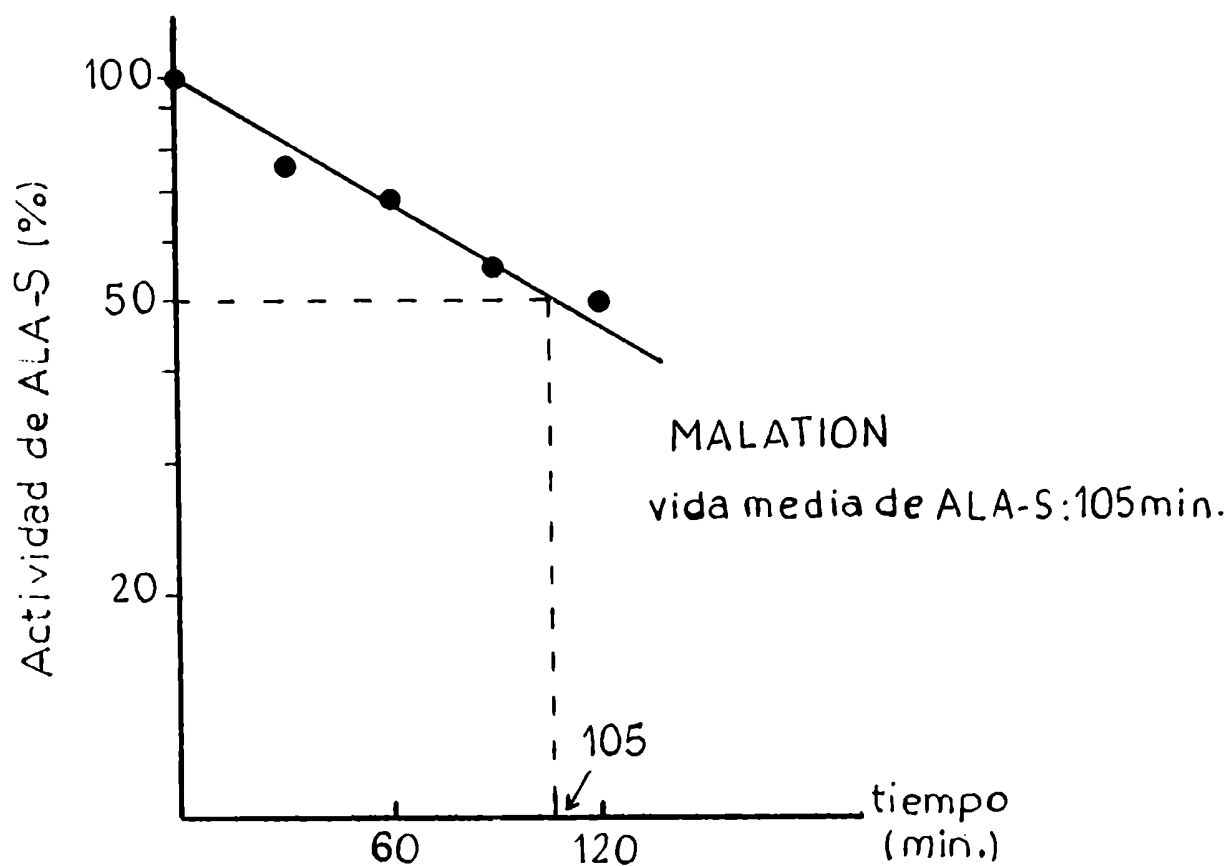


Figura 36: Vida media de ALA-S en los embriones tratados con malatión. Cada punto representa el promedio de 7 determinaciones.

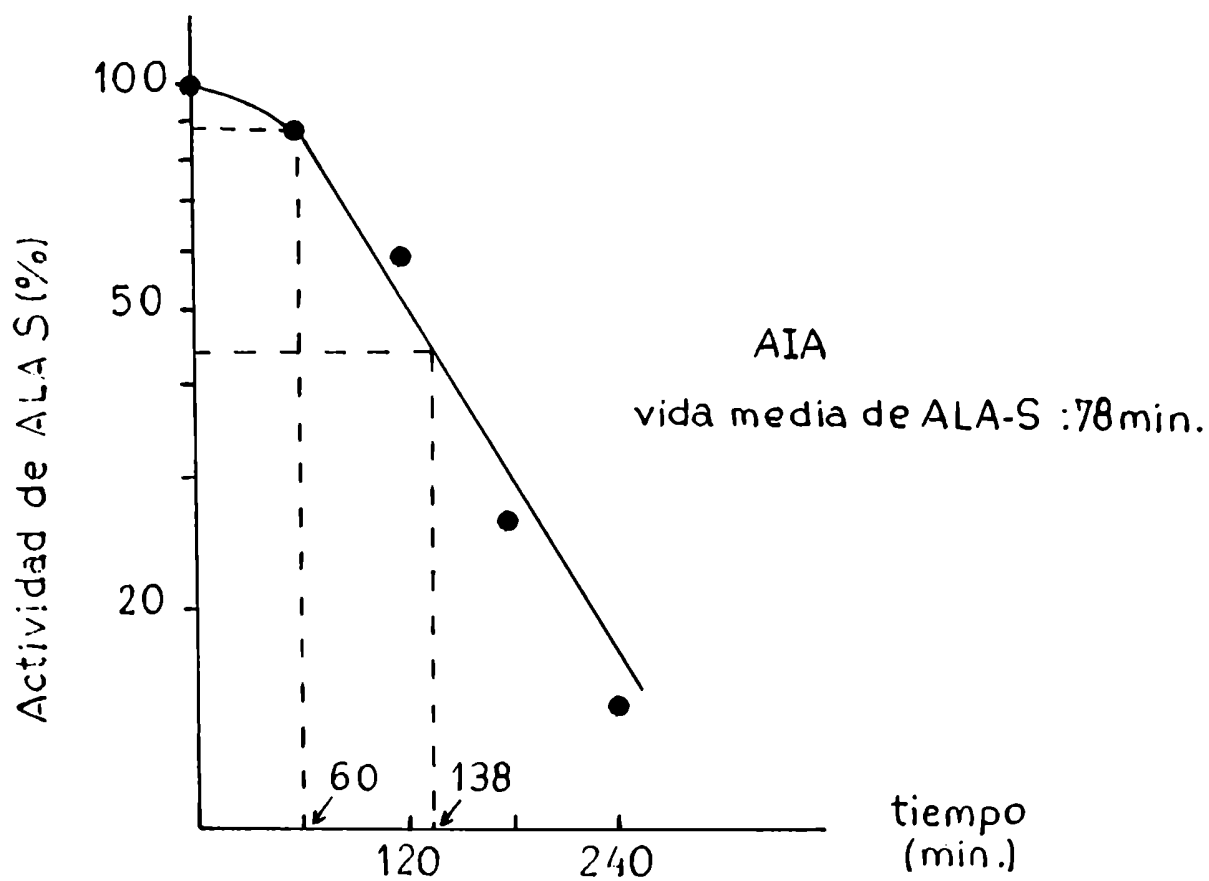


Figura 37: Vida media de ALA-S en los embriones tratados con AIA. Cada punto representa el promedio de 8 determinaciones.

TABLA 4: EFECTO DE LA ADMINISTRACION CONJUNTA DE MALATION Y ACTINOMICINA D SOBRE ALA-S.

| Tratamiento | Actividad de ALA-S (nmoles de ALA/g.híg. x 40 min.) |
|---------------------------|--|
| Malatión | 33.8 ± 3.9 |
| Malatión + Actinomicina D | 8.6 ± 2.4 • |

Los embriones fueron tratados con el plaguicida y actinomicina D durante 3.5 horas. Los valores informados corresponden al promedio de 7 determinaciones ± el error estandard. • Significativamente diferente de malatión: $p < 0.01$.

Por otro lado se investigó el efecto de la Actinomicina D cuando esta se agregaba una vez producido el aumento de ALA-S por el plaguicida.

Se trataron los embriones con malatión durante 3,5 horas, luego se inyectó una primera dosis de Actinomicina D (300 ug) y 3 horas más tarde una segunda dosis del inhibidor (50 ug). Los embriones que recibieron ambas drogas se mataron 3, 5 y 7 horas después de la inyección de la primera dosis de Actinomicina D. Un grupo de embriones fue tratado solamente con el plaguicida durante 3,5 horas.

Se encontró que la actividad de ALA-S (Figura 38) continúa aumentando hasta 3 horas después de dada la inyección del inhibidor y luego comienza a descender. Es decir que al menos durante 3 horas después de la inyección de Actinomicina D persisten los m-RNA de ALA-S y se produce síntesis de nueva enzima. En realidad este aumento neto de actividad de ALA-S indica que aún después de la inyección del inhibidor existe por algún tiempo síntesis de nuevos m-RNA, es decir que la acción del mismo no es inmediata, si así lo fuera la actividad se mantendría un tiempo constante en el valor de 3,5 horas pero no aumentaría.

A continuación de este incremento se observa una caída de actividad tal que al cabo de 7 horas de la primera inyección del inhibidor se observa una muy baja formación de ALA.

Para continuar investigando si la acción de este plaguicida es a nivel de transcripción se pensó que si el aumento de actividad de ALA-S se debía a un aumento de traducción al inyectar simultánea

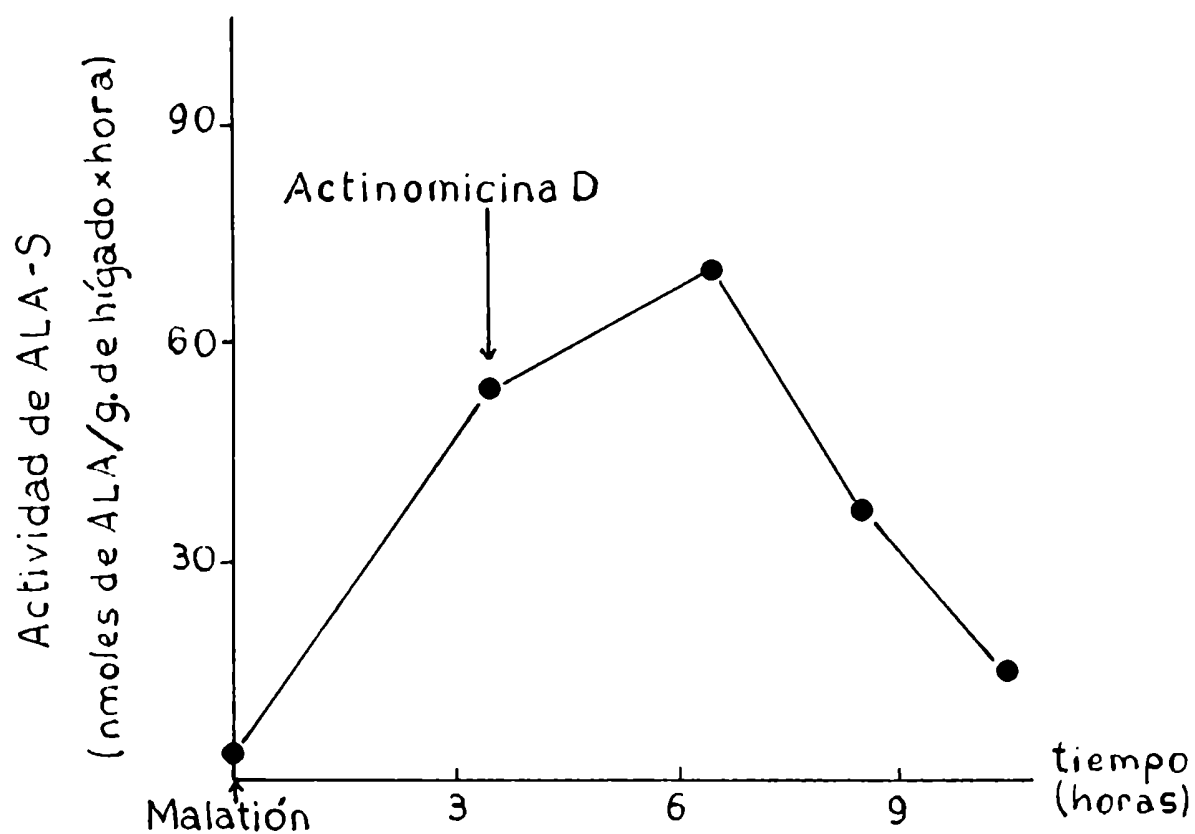


Figura 38: Efecto de la inyección de Actinomicina D una vez producido el aumento de ALA-S por malatión. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.

mente malatión y actinomicina D y analizar la actividad enzimática a tiempos suficientemente cortos tales que persistan los m-RNA de ALA-S, deberíamos observar aumento de esta actividad debido a que estos mensajeros se estarían traduciendo más rápidamente.

Si, en cambio, el aumento de actividad requiere aumento de m-RNA no habrá inducción en presencia de Actinomicina D a tiempos cortos.

Teniendo en cuenta nuestros resultados previos (Figura 38) estos tiempos cortos podrían ser de aproximadamente 3 horas.

Por otro lado se quiso evaluar si el plaguicida producía aumento de actividad a tiempos todavía más cortos que éste lo que permitiría disminuir aún más el período de tratamiento empleado en el nuevo experimento.

Por ello se estudió el aumento de ALA-S producido, por malatión al dejar actuar la droga durante poco tiempo. Se encontró que recién 2,5 horas después de inyectado se puede hallar un incremento consistente de actividad (Tabla 5).

Se repitió entonces el experimento de inyección simultánea de malatión y actinomicina D y se determinó al cabo de 2,5 horas la actividad de ALA-S. También en este caso en presencia de Actinomicina D se inhibió el aumento de ALA-S por el plaguicida (Tabla 6) lo cual nuevamente sugeriría una acción del malatión a nivel de transcripción.

TABLA 5: EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LOS EMBRIONES CON MALATION DURANTE CORTOS

PERIODOS DE TIEMPO.

| Tiempo (horas) | Actividad de ALA-S (nmoles de ALA/g.híg. x 40 min.) |
|-------------------|--|
| 0 | 3.4 ± 0.6 (4) |
| 1.5 | 6.1 ± 1.5 (3) |
| 2 | 9.5 ± 2.3 (3) |
| 2.5 | 18.7 ± 2.3 (5) |

Los números entre paréntesis indican la cantidad de determinaciones realizadas en cada caso. Se presenta el promedio ± el error standard.

TABLA 6: EFECTO DE LA ADMINISTRACION CONJUNTA DE MALATION Y ACTINOMICINA D SOBRE ALA-S.

| Tratamiento | Actividad de ALA-S (nmoles de ALA/g.hfg. x 40 min) |
|---------------------------|--|
| Malati6n | 18.7 \pm 2.3 (5) |
| Malati6n + Actinomicina D | 8.6 \pm 1.4 (3) |

Los embriones fueron tratados con el plaguicida y actinomicina D durante 2.5 horas. Los n6meros entre par6ntesis indican la cantidad de determinaciones realizadas. Se presenta el promedio \pm el error standard.

III - 4. Efecto de hemina sobre el aumento de ALA-S producido por malatión.

Se investigó el efecto de la hemina sobre este aumento de actividad cuando se inyecta conjuntamente con malatión.

Los embriones se incubaron durante 3,5 horas con ambas drogas y luego se determinó la actividad de ALA-S. Los resultados aparecen en la Tabla 7.

Mientras que la dosis de 3 mg/embrión no produjo una variación significativa de ALA-S, al aumentar la dosis de hemina a 5 mg/embrión hubo un decremento significativo de esta actividad enzimática.

A continuación se estudió el efecto de la hemina cuando se inyectaba después de haber dejado incrementar la actividad enzimática con malatión durante 3 horas. Como puede verse en la Figura 39, los embriones tratados sólo con el plaguicida aumentaron la actividad enzimática al aumentar el tiempo de tratamiento con la droga mientras que en aquéllos tratados con hemina fue impedido este aumento de actividad, manteniéndose prácticamente el valor hallado en el momento de la inyección de hemina.

Es decir que la hemina inhibe parcialmente el aumento de actividad provocado por el plaguicida.

TABLA 7: EFECTO DE LA INYECCION CONJUNTA DE MALATION Y HEMINA SOBRE ALA-S.

| Tratamiento | Actividad de ALA-S (nmoles de ALA/g.híg. x 40 min.) |
|--------------------------|--|
| Malatión | 26.9 ± 4.9 (6) |
| Malatión + Hemina (3 mg) | 22.9 ± 6.0 (4) |
| Malatión + Hemina (5 mg) | 13.4 ± 3.8 • (7) |

Los números entre paréntesis indican el número de determinaciones realizadas. Se presenta el promedio ± el error estándar. • Significativamente diferente de malatión: $p \leq 0.05$.

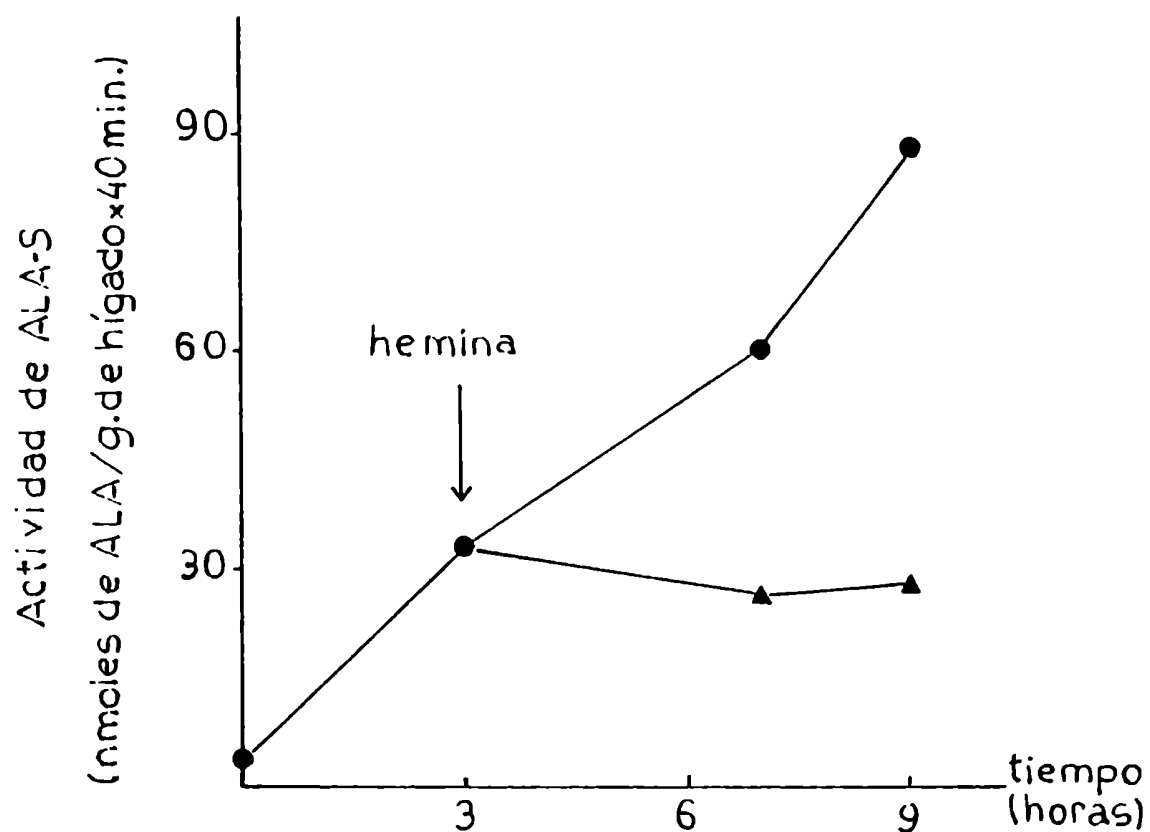


Figura 39: Efecto de la inyección de hemina una vez producido el aumento de ALA-S por malatión. Los valores corresponden al promedio de 5 determinaciones. Los símbolos representan: ● malatión y ▲ malatión + hemina.

III - 5. Efecto del agregado de malatión "in vitro" sobre la actividad de ALA-S normal.

Los resultados obtenidos hasta aquí indicarían que la acción del plaguicida involucra síntesis de nueva proteína; de todos modos para descartar un efecto de la droga "per se" sobre la actividad de ALA-S se realizaron algunos ensayos "in vitro". En estos se incubaron homogenatos de embriones normales en presencia de cantidades de malatión entre 10 y 10000 veces inferiores a las inyectadas en los embriones teniendo en cuenta las diluciones que sufre el plaguicida en el embrión. Estas cantidades corresponden a un rango entre 6 y 6×10^{-3} g/l respectivamente, o sea $9,1 \times 10^{-3}$ y $9,1 \times 10^{-6}$ M.

El malatión se agrega disuelto en 0,1 ml de DMSO y a los controles sin malatión se les agrega 0,1 ml de este solvente.

Como puede verse en la Tabla 8 en ningún caso se encontró un efecto directo del plaguicida sobre la actividad de ALA-S.

III - 6. Efecto del FB sobre el aumento de ALA-S producido por malatión.

Teniendo en cuenta que la droga "per se" no aumenta la actividad de ALA-S se quiso evaluar si el aumento de ALA-S producido "in ovo" por malatión podía ser atribuido a algún metabolito de éste.

TABLA 8: EFECTO DEL AGREGADO DE MALATION "IN VITRO" SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALA-S DE

HIGADO DE EMBRIONES NORMALES.

| Malatión (molaridad) | Actividad de ALA-S (nmoles de ALA/g.híg. x 40 min.) |
|-------------------------|--|
| --- | 8 ± 2.8 |
| 9.1 10 ⁻⁶ | 11.4 ± 4.7 |
| 9.1 10 ⁻⁵ | 5.9 ± 1.7 |
| 9.1 10 ⁻⁴ | 7.5 ± 3.6 |
| 9.1 10 ⁻³ | 5.7 ± 0.9 |

Se incubó el homogenato de hígado de embriones de pollo normales en presencia de distintas cantidades de malatión que se agregó disuelto en 0.1 ml de DMSO. A los controles sin malatión se les adicionó 0.1 ml de DMSO. En cada caso se presenta el promedio de 3 determinaciones ± el error standard.

Por ello se investigó el efecto del FB sobre este incremento para ver si a este nivel se encontraba algún efecto, pese a que éste no había sido observado en los estudios de acumulación de porfirinas.

En un primer experimento se pretrataron los embriones con FB durante 1 hora y luego se inyectó el plaguicida. Al cabo de 2,5 horas se mataron los animales y se determinó la actividad de ALA-S encontrándose los resultados que aparecen en la Tabla 9.

Teniendo en cuenta los aumentos producidos separadamente por el malatió n y el FB la inyección conjunta de ambos no parece tener efectos sinérgicos.

Luego se repitió el experimento pero dejando actuar más tiempo las drogas. Esta vez se mataron los embriones 4,5 horas después de la inyección del plaguicida. Como era de esperar se obtuvo un mayor efecto de cada una de estas drogas (Tabla 10). Sin embargo tampoco en este caso se encontraron efectos sinérgicos confirmando los resultados previos.

Es decir que el tratamiento con FB no mejoró la respuesta del plaguicida a nivel de actividad de ALA-S. Este hecho está de acuerdo con la falta de efecto de este inductor informada en la Sección I de Resultados cuando se estudió su acción sobre la acumulación hepática de porfirinas producida por malatió n.

TABLA 9: EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON FENOBARBITAL SOBRE EL AUMENTO DE ALA-S

PRODUCIDO POR MALATION AL CABO DE 2.5 HORAS.

| Tratamiento | Actividad de ALA-S (nmoles de ALA/g.híg. x hora) |
|---------------|---|
| DMSO | 5.1 ± 0.9 (3) |
| Malatión | 27.6 ± 3.4 (5) |
| DMSO + FB | 18.4 ± 3.6 (4) |
| Malatión + FB | 45.3 ± 18.9 (3) |

Se pretrataron los embriones con FB durante 1 hora y luego se inyectó el plaguicida; 2.5 horas después de esta última inyección se mataron los embriones y se midió la actividad de ALA-S. Los números entre paréntesis indican la cantidad de determinaciones realizadas. En cada caso se presenta el promedio ± el error estandar.

TABLA 10: EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON FENOBARBITAL SOBRE EL AUMENTO DE ALA-S PRODUCIDO

POR MALATION AL CABO DE 4.5 HORAS.

| Tratamiento | Actividad de ALA-S (nmoles de ALA/g.híg. x hora) |
|---------------|---|
| DMSO | 5.4 ± 1.5 (3) |
| Malatión | 33.6 ± 5.8 (6) |
| Malatión + FB | 76.7 ± 15.1 (8) |
| DMSO + FB | 48.1 ± 5.0 (10) |

Los embriones se pretrataron con FB durante 1 hora y luego se inyectó el malatión. Al cabo de 4.5 horas de esta última inyección se mataron los embriones y se midió la actividad de ALA-S. Los números entre paréntesis indican la cantidad de determinaciones realizadas. En cada caso se presenta el promedio ± el error estandard.

III - 7. Efecto de malatión sobre la actividad hepática de ferroquelatasa.

También se quiso investigar si el malatión altera la actividad hepática de Ferroquelatasa, enzima que cataliza la formación de hemo.

Se inyectaron los embriones con el plaguicida y al cabo de 4 horas se extrajeron los hígados y se midió esta actividad.

El tratamiento con malatión produjo un decremento parcial pero significativo de la actividad de Ferroquelatasa respecto a los controles de DMSO (Tabla 11).

III - 8. Estudios sobre la distribución subcelular de la actividad de ALA-S.

Para determinar la distribución subcelular de ALA-S se midió esta actividad enzimática en el homogenato y en las distintas fracciones subcelulares en presencia de un sistema generador de Succinil CoA. Se utilizó Succinil CoA-S obtenida a partir de Escherichia coli como se detalló en Métodos (Sección I-6).

También se midió la actividad de SDH, enzima localizada en la membrana interna de la mitocondria, como marcador mitocondrial.

Se encontró que en los embriones controles tratados con DMSO esta actividad enzimática sólo aparece en la fracción mitocondrial (Tabla 12).

TABLA 11: EFECTO DEL MALATION SOBRE LA ACTIVIDAD HEPATICA DE FERROQUELATASA.

| Tratamiento | Actividad de ferroquelatasa (nmoles de mesohemo/g.híg. x hora) | |
|-------------|---|------|
| DMSO | 245 ± | 19 |
| Malatión | 142 ± | 20 * |

Se trataron los embriones con malatión durante 4 horas y luego se mataron y se midió la actividad de ferroquelatasa como se indica en Métodos. En cada caso se presenta el promedio de 4 determinaciones ± el error estandard. * Significativamente diferente del control de DMSO: $p \leq 0.05$.

TABLA 12: DISTRIBUCION SUBCELULAR DE ALA-S EN LOS EMERIONES CONTROLES.

| Fracción Subcelular | Actividad de ALA-S (nmoles de ALA/g.de híg. x hora) | Actividad de SDH (unidades/g.de híg.) |
|------------------------|--|--|
| Homogenato | 3.8 | 490 |
| Mitocondrias | 3.4 | 410 |
| Microsomas | --- | 37 |
| Soluble | --- | --- |

El fraccionamiento subcelular y las mediciones de ALA-S en presencia de Succ CoA-S y de SDH se realizaron según se describe en Métodos.

Cuando se realizó el estudio con embriones tratados con mala_{ti}ón se observó que aquéllos que tenían muy aumentada la actividad de ALA-S, la mayor parte de ésta se localizaba en las mitocondrias pero entre un 15 y un 20% aparecía en el soluble (Tabla 13).

Aunque cuando los aumentos de actividad eran bastantes menores (inferiores al 50% del valor que aparece en la Tabla 13) no se detectaba actividad en el soluble.

Podría ser que la actividad observada en el soluble se debiera a ruptura de las mitocondrias, lo cual llevaría a una libera_{ci}ón de enzima al citosol.

Para evaluar esta posibilidad se decidió repetir la determinación de la distribución subcelular empleando la metodología anterior pero midiendo como marcadores mitocondriales además de la actividad de SDH, la de GDH, enzima ubicada en la matriz mitocondrial. Como puede verse en la Tabla 14, aproximadamente un 10% de la acti_{vi}dad de ALA-S apareció en la fracción soluble mientras que sólo se encontró un 2% de la actividad de GDH en esta fracción. Por lo tanto existe un incremento real de actividad de ALA-S en el citosol de los embriones tratados con el plaguicida que no puede ser asignado a contaminación con la matriz mitocondrial. Cabe señalar que el valor de actividad del homogenato que se muestra en la Tabla 14, pese a no ser tan alto como el que aparece en la Tabla 13, produce aparición de actividad en el soluble si bien esta actividad es bastante baja (en términos absolutos) y representa un porcentaje inferior al hallado en el primer caso (Tabla 13).

TABLA 13: DISTRIBUCION SUBCELULAR DE ALA-S EN LOS EMBRIONES TRATADOS CON MALATION.

| Fracción Subcelular | Actividad de ALA-S (nmoles de ALA/g.de híg. x hora) | Actividad de SDH (unidades/g. de híg.) |
|------------------------|--|---|
| Homogenato | 78.8 | 281 |
| Mitochondrias | 51.9 | 251 |
| Microscomas | 2.9 | 9 |
| Soluble | 17.2 | --- |

El fraccionamiento subcelular y las mediciones de ALA-S en presencia de Succ CoA-S y de SDH se realizaron según se describe en Métodos.

TABLA 14: DISTRIBUCION SUBCELULAR DE ALA-S EN LOS EMBRIONES TRATADOS CON MALATION.

| Fracción Subcelular | Actividad de ALA-S (nmoles de ALA/g.de híg.x hora) | Actividad de SDH (unidades/g.de híg.) | Actividad de GDH (unidades/g.de híg.) |
|---------------------|---|--|--|
| Homogenato | 44.4 | 372 | 384 |
| Mitocondria | 38.8 | 352 | 369 |
| Microsomas | --- | --- | --- |
| Soluble | 4.3 | --- | 8 |

· El fraccionamiento subcelular y las mediciones de ALA-S en presencia de Succ CoA-S, de SDH y de GDH se realizaron según se describe en Métodos.

Sin embargo, teniendo en cuenta que la metodología empleada en ambos casos para el fraccionamiento fue la misma cabe suponer que también en el primer caso la actividad medida en el citosol corresponde a ALA-S soluble.

DISCUSION .

Se ha encontrado que el aumento de ALA-S provocado por el malatión es bloqueado por inhibidores de la síntesis proteica a nivel de traducción (cicloheximida) y transcripción (Actinomicina D). Esto mostraría que se halla involucrada la síntesis de proteínas y por lo tanto se trataría de una inducción.

Cuando estos inhibidores están presentes desde un comienzo del tratamiento de los embriones con el plaguicida este bloqueo es prácticamente total coincidiendo estos resultados con los hallados para otras drogas porfirinogénicas muy conocidas como AIA y DDC (47, 177).

Estudios con cicloheximida permitieron determinar una vida media de ALA-S de 105 minutos en los embriones tratados con malatión.

Cabe señalar que en todos los experimentos realizados excepto en los estudios de distribución subcelular se midió la actividad de ALA-S en ausencia de Succinil CoA y por ende se determinó solamente la enzima mitocondrial, aunque como se ha visto ésta constituye la fracción mayoritaria y en algunos casos prácticamente total.

En los embriones tratados se observó una disminución lineal de la actividad de ALA-S luego de inyectar Cicloheximida mientras que, en los embriones tratados con AIA luego de un pequeño decremento de actividad la enzima decae exponencialmente con una vida

media de 78 minutos. Algunos autores (30, 32) también encuentran al utilizar AIA como inductor que el decaimiento de ALA-S presenta un comportamiento bifásico, aunque a diferencia de lo aquí informado la pérdida de actividad parece ser mayor en un comienzo y luego disminuir.

Se ha informado que la vida media del ALA-S inducida por AIA en hígado de embriones de pollo White Leghorn "in ovo" es de 15-20 minutos (47), en cultivo de hepatocitos es de 3 horas (176) ó 3,8 horas (177) y en cultivos de órgano de 2 horas (47). Por otro lado la vida media del ALA-S inducida por DDC en cultivo de hígado de embriones de pollo es de 4 - 5 horas, es decir, el doble de la inducida por AIA. Estas diferencias parecen deberse a una menor velocidad de recambio de la enzima en los hígados tratados con DDC más que a una estabilización de la enzima por DDC (47). Es decir que la vida media de ALA-S varía ampliamente dependiendo del sistema en que se estudian las células del hígado así como las drogas utilizadas como inductoras.

La primera de estas causas podría justificar la diferencia con los datos aquí presentados en la vida media y en el comportamiento de la enzima inducida por AIA tanto más si se tiene en cuenta el diferente tipo de embriones utilizados (New Hampshire en vez de White Leghorn). La segunda causa de variabilidad de la vida media de ALA-S, es decir la droga usada como inductora, justificaría las diferencias halladas entre la enzima resultante del tratamiento con AIA y malatió n"in ovo". Estas diferencias pare-

cerían indicar o bien que la proteína formada no es la misma o que la estabilidad de la proteína formada es diferencialmente afectada por estas drogas.

La primera razón es poco probable si se tiene en cuenta que estas diferencias como ya se ha señalado también se encuentran con AIA y DDC y sin embargo no hay evidencias de que produzcan isoenzimas diferentes y la enzima normal migra en electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS igual que la inducida (174). Además al tratar los embriones con AIA + DDC se ha purificado una única enzima (21, 28).

Por otro lado cuando se agrega Actinomicina D a embriones pretratados con malatión se observa un aumento de actividad de ALA-S hasta 3 horas después de la inyección del inhibidor y luego disminuye hasta valores muy bajos.

El aumento de actividad luego de la administración de Actinomicina D muestra que hay síntesis de nuevos mensajeros por algún tiempo después de esta administración, es decir que el inhibidor tarda un tiempo en actuar. Algo similar sucede con el malatión que tarda unas 2,5 horas en producir aumento de actividad de ALA-S. Este tiempo que tarda en actuar la Actinomicina D debe ser infe-rior a las 2,5 horas si se tiene en cuenta que cuando se inyectan simultáneamente malatión + Actinomicina D y se mide al cabo de 2,5 horas la actividad de ALA-S, ésta se encuentra disminuída lo que demuestra la acción del inhibidor.

También Strand y colab. (177) trabajando con cultivo de hepatocitos de embrión de pollo tratados con AIA encuentran un incremento de actividad posterior a la inyección de Actinomicina D aunque algo menor al aquí presentado. Esto parece razonable ya que probablemente el acceso de este inhibidor hasta su sitio de acción podría ser más rápido y más eficiente trabajando en cultivo de hepatocitos que en el embrión "in ovo".

En cambio Tomita y colab. (47) encuentran que en cultivo de hígado de embrión de pollo cuando se agrega Actinomicina D en el medio de la inducción de ALA-S por AIA, la actividad de ALA-S se mantiene constante durante aproximadamente 2 horas y luego disminuye por lo que sugieren una vida de 2 a 3 horas para el m-RNA de ALA-S.

Se vió por un lado, que ya 2,5 horas después de la inyección de malatión la actividad de ALA-S está sensiblemente incrementada, y por otro lado de acuerdo a nuestros resultados así como los de Tomita y colab. (47) los m-RNA de ALA-S persisten al menos durante ese tiempo. Por lo tanto cuando se inyecta simultáneamente malatión + Actinomicina D y al cabo de 2,5 horas no se encuentra aumento de actividad, ésto sugiere que el incremento de ALA-S se debe a la síntesis de nuevos mensajeros más que a la activación de los preexistentes.

De acuerdo a estos resultados esta droga actuaría a nivel de transcripción coincidiendo con lo informado tanto para AIA (20,

47, 178) como para DDC (20, 47, 176, 178).

La confirmación de estos resultados requerirían el aislamiento y cuantificación del m-RNA específico de ALA-S en los embriones controles y tratados con malatión.

La hemina produce una inhibición significativa aunque no total del aumento de ALA-S provocado por el malatión en la dosis de 5 mg/embrión tanto si se lo inyecta simultáneamente con el plaguicida o si se agrega una vez aumentada la actividad enzimática.

Estos resultados coinciden con los informados en cultivo de hígado de embrión de pollo donde el grado de inhibición por hemina de la inducción de ALA-S por AIA y por DDC fue parcial ya sea que la hemina se agregara al medio de incubación al comienzo o en la mitad de la inducción (47).

Es decir que el hemo estaría cumpliendo su papel regulatorio sobre el incremento de ALA-S producido por el plaguicida fosforado.

En concordancia con el efecto inductor del malatión, al realizar ensayos "in vitro" en presencia de la droga se encontró que ésta no actúa "per se" sobre la actividad de ALA-S.

La falta de efecto del FB sobre el aumento de ALA-S por malatión y la acumulación de porfirinas producida por este plaguicida descartan una acción mediada por metabolito formado a través de las enzimas metabolizantes de drogas inducibles por FB.

Si la acción de la droga no fuera a través de un metabolito o sea que actuara la droga "per se" esto corroboraría aún más el efecto in-

ductor del malati6n sobre el ALA-S.

Adem6s se ha encontrado algo disminu6da la actividad de Ferroquelatasa en los embriones tratados con el plaguicida. Si esta inhibici6n disminuyera el "pool" regulatorio de hemo, este hecho podr6a estar involucrado en la inducci6n de ALA-S.

Sin embargo esto ser6a poco probable si se tienen en cuenta algunos trabajos realizados con embriones de pollo donde se ha visto que la disminuci6n de Ferroquelatasa no provoca inducci6n de ALA-S lo que implicar6a que el "pool" de hemo intracelular tiene una muy baja velocidad de recambio o utilizaci6n de modo que no disminuye significativamente a6n despu6s de haber sido inhibida la bios6ntesis de hemo por varias horas (181, 206, 220).

De todos modos la inhibici6n de Ferroquelatasa podr6a favorecer el aumento de ALA-S a6n cuando no fuera la causa inicial de este aumento.

Como se ha visto el aumento de ALA-S producido por malati6n ocurre principalmente en la fracci6n mitocondrial aunque puede aparecer un poco de actividad en el soluble sobre todo cuando el incremento de los niveles de ALA-S es muy importante. Se vi6 (48) que en un primer momento en ratas tratadas con AIA los niveles de ALA-S mitocondrial son considerablemente mayores que en el soluble lo que sugiere que la enzima sintetizada en polirribosomas citos6l^{icos} se incorpora r6pidamente a la mitocondria. Luego de un tiempo, sin embargo, el nivel de enzima es mayor en el citosol que en la

mitocondria.

Así, ALA-S puede acumularse en el citosol cuando la velocidad de síntesis es superior a la velocidad de incorporación a la mitocondria. Y, por otro lado, la capacidad de incorporación a la mitocondria puede limitarse a un cierto nivel de enzima. Esto justificaría los resultados hallados en el presente trabajo ya que cuando mayor es el aumento de actividad producido por el malatión más apreciable es la actividad encontrada en el soluble.

En contraste con lo observado en mamíferos y pollos adultos (25, 30, 32) se ha informado que en el hígado de embrión de pollo ya sea en cultivo o "in ovo" no se detecta actividad o se detecta una actividad extremadamente pequeña en el citosol luego del tratamiento con AIA o DDC (27, 47). Sin embargo como se ha determinado la existencia del precursor de ALA-S en el citosol del hígado de embrión de pollo (23), se ha postulado que podría ser inactivo o que sus niveles podrían ser muy bajos para detectar actividad.

El primer postulado parecería poco probable teniendo en cuenta que: a) el precursor de ALA-S de hígado de rata es activo y estudios preliminares indicarían una alta homología en la secuencia de pre-ALA-S de hígado de rata y embrión de pollo (38); b) cuando se estudió el efecto de la secuencia extra de pre-ALA-S sobre algunas propiedades de la enzima de hígado de pollo (26) se vió que la enzima soluble purificada posee una actividad específica comparable a la purificada de mitocondria, ambas exhiben actividad máxima a pH 7,6 y los valores de Km para glicina y succinil-CoA son de

4,8 mM y 2,7 μ M respectivamente para ambas. Estos resultados sugieren que el centro activo de ALA-S no puede ser significativamente influenciado por la secuencia extra. Apoyando este hecho se informó que la ribonucleasa pancreática (314) y la amilasa (315) son catalíticamente activas con la secuencia extra.

En el presente estudio se ha observado una pequeña actividad de ALA-S en la fracción soluble del hígado de embrión de pollo, que no podría ser atribuida a contaminación con matriz mitocondrial. Esto sugeriría que el precursor citosólico de esta enzima tiene actividad; aunque cabe aclarar que los embriones utilizados (New Hampshire) son de una raza diferente a los empleados en todos los trabajos citados (White Leghorn).

CONCLUSIONES.

En el presente trabajo de tesis se ha encontrado que dos plaguicidas clorados: clordano y endosulfán así como dos plaguicidas fosforados: paratión y malatión producen distinto grado de incremento del contenido hepático de porfirinas al ser administrados a embriones de pollo New Hampshire "in ovo". Tanto el paratión como el endosulfan provocan incrementos notables. El clordano eleva en menor grado los niveles de porfirinas y el malatión los modifica levemente. La acumulación de porfirinas provocada por estos plaguicidas no es afectada por el tratamiento con FB, SKF 525A o DDC. La falta de efecto del FB y SKF 525A podría deberse a que las isoenzimas del citocromo P-450 inducibles por FB no participan en la metabolización de estos plaguicidas. En cuanto al DDC, su falta de efecto indicaría que no está disminuida la acumulación de porfirinas debida a los plaguicidas como consecuencia de su pasaje a hemo o hemoproteínas. La actividad hepática de ALA-S es levemente incrementada por clordano y muy aumentada por malatión. En contraste paratión y endosulfan no afectan la actividad de esta enzima pese a producir notables incrementos de porfirinas. Es decir que el aumento de ALA-S y la acumulación de porfirinas no se correlacionan. Si bien ya se sabía que varios compuestos clorados afectaban este camino biosintético, era poco lo estudiado acerca del efecto de compuestos fosforados. Desde este punto de vista resultan importantes los resultados obtenidos en este trabajo tanto

con paratión como con malatión.

Por otro lado, teniendo en cuenta el uso de estos plaguicidas en la agricultura los resultados obtenidos podrían ser, quizás, importantes desde el punto de vista de la porfiria para aquellas personas que llevan el rasgo hereditario latente para las cuales a veces una mínima dosis desencadena el cuadro porfirico.

En cuanto al lindano al ser administrado a ratas incrementa la excreción de ALA, PBG y porfirinas en orina y porfirinas en heces, aunque estos incrementos son pequeños si se los compara con los producidos por un compuesto químicamente relacionado: el Hexa-clorobenceno. Por otro lado el lindano no altera la actividad hepática ni de ALA-S ni de PCL a diferencia del HCB que produce una notable inhibición de PCL y un consecuente aumento de ALA-S. Por lo tanto esta droga tiene una pobre capacidad porfirinogénica comparada con el HCB.

Como se ha dicho el malatión además de aumentar el contenido de porfirinas también aumenta notablemente la actividad de ALA-S en el hígado de los embriones de pollo. Este plaguicida al igual que AIA y DDC parece inducir la actividad de ALA-S a nivel de transcripción de acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos con inhibidores de la síntesis proteica como cicloheximida y actinomicina D. Esta inducción es bloqueada parcialmente por he-mina. Ni la droga "per se" ni un metabolito formado a partir del sistema enzimático inducible por Fenobarbital afectan esta induc-

ción enzimática.

El aumento de actividad de ALA-S ocurre principalmente en la fracción mitocondrial aunque puede encontrarse una pequeña actividad en soluble siendo esta última mayor cuando mayor es el aumento de ALA-S.

Por último el malatión disminuye parcialmente la actividad de Ferroquelatasa lo cual podría contribuir a mantener elevados los niveles de ALA-S aunque no sería el causante de esta inducción. Así se ha encontrado que un plaguicida fosforado el malatión causa un notable aumento de actividad de ALA-S y, desde este punto de vista, podría ser utilizado al igual que AIA y DDC para producir una porfiria experimental que sirva de herramienta para estudiar la regulación del camino biosintético del hemo.

L. San Martín

Quirica del Valle

B I B L I O G R A F I A .

- 1) Shemin, D. y Rittenberg, D. (1946) J. Biol. Chem. 166, 621.
- 2) Shemin, D. y Rittenberg, D. (1946) J. Biol. Chem. 166, 627.
- 3) Muir, H. M. y Newberger, A. (1949) Biochem.J. 45, 163.
- 4) Shemin, D. The succinate-glycine cycle: The role of δ -amino
levulinic acid in porphyrin synthesis, in Porphyrin Biosynthe
sis and Metabolism. Ciba Foundation, Churchill, London, 1955.
- 5) Muir, H. M. y Newberger, A. (1950) Biochem J. 47, 97.
- 6) Radin, N. S., Rittenberg, D. y Shemin, D. (1950) J. Biol. Chem.
184, 745.
- 7) Shemin, D. y Russell, C. S. (1953) J. Am. Chem. Soc. 75, 4873.
- 8) Shemin, D.; Rusel, C. S. y Ahramsky, T. (1955) J. Biol. Chem.
215, 613.
- 9) Newberger, A. y Scott, J. J. (1953) Nature (Lond.) 172, 1093.
- 10) Diesel, E. I. B. y Falk, J. E. (1953) Nature (Lond.) 172, 1185.
- 11) Scholnick, P. L.; Hammaker, L. E. y Marver, H. S. (1972) J.
Biol. Chem. 247, 4132.
- 12) Akhtar, M.; Abboud, M. M.; Barnard, G.; Jordan, P. y Zaman, Z.
(1976) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 273, 117.

- 13) Kikuchi, G.; Kuman, A.; Talmage, P. y Shemin, D. (1958) J. Biol. Chem. 233, 1214.
- 14) Tait, G. H. (1973) Biochem. J. 131, 389.
- 15) Burnham, B. F. Metabolism of porphyrins and corrinoids, in Metabolic Pathways, 3^a ed., editado por David M. Greenberg, Vol. 3, cap. 18 Academic, New York (1969).
- 16) Granick, S. y Sassa, S. δ -Aminolevulinic acid synthetase and the control of heme and chlorophyll synthesis, in Metabolic Regulation, editado por H. J. Vogel, pag. 77, Academic, New York and London (1971).
- 17) Zuyderhoudt, F. M.; Borst, P. y Huijing, F. (1969) Biochim. Biophys. Acta 178, 408.
- 18) Scotto, A. W.; Chang, L. L. y Beattie, D. S. (1983) J. Biol. Chem. 258, 81.
- 19) Yamauchi, K.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1746.
- 20) Whiting, M. J. (1976) Biochem. J. 158, 391.
- 21) Ades, I. Z. y Harpe, K. G. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9329.
- 22) Srivastava, G.; Borthwick, I. A.; Brooker, J. D.; Wallace, J. C.; May, B. K. y Elliot, W. H. (1983) Biochim. Biophys. Res. Commun. 117, 344.

- 23) Srivastava, G.; Borthwick, I. A.; Brooker, J. D.; May, B. K. y Elliot, W. H. (1983) Biochim. Biophys. Res. Commun. 110, 23.
- 24) Lascelles, J. (1975) Ann. N. Y. Acad. Sci., 244, 334.
- 25) Scholnick, P. L.; Hammaker, L. E. y Marver, H. S. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4126.
- 26) Watanabe, N.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1984) Arch. Biochem, Biophys. 232, 118.
- 27) Whiting, M. y Granick, S. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1340.
- 28) Bortwick, I. A.; Srivastava, G.; Brooker, J. D.; May, B. K. y Elliot, W. H. (1983) Eur. J. Biochem. 129, 615.
- 29) Kaplan, B. H. (1971) Biochim. Biophys. Acta 235, 381.
- 30) Hayashi, N; Yoda, B. y Kikuchi, G. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 131, 83.
- 31) Whiting, M. J. y Elliot, W. H. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6818.
- 32) Ohashi, A. y Kikuchi, G. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 153, 34.
- 33) Nakakuki, M.; Yamauchi, K.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1738.
- 34) Yamamoto, M.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 985.

- 35) Simpson, D. M. y Beattie, D. S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1630.
- 36) Yamamoto, M.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 225.
- 37) Pirola, B. A.; Mayer, F.; Borthwick, I. A.; Srivastava, G.; May, B. K. y Elliot, W. H. (1984) Eur. J. Biochem. 144, 577.
- 38) Borthwick, I. A.; Srivastava, G.; Day, A. r.; Pirola, B. A.; Snoswell, M. A.; May, B. K. y Elliot, W. H. (1985) Eur. J. Biochem. 150, 481.
- 39) Anderson, L. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2407.
- 40) Horwich, A. L.; Fenton, W. A.; Williams, K. R.; Kalousek, F.; Kraus, J. P.; Doolittle, P. F.; Kongisberg, W. y Rosenberg, L. E. (1984) Science (Wash, D. C.) 224, 1068.
- 41) Hay, R.; Bohni, P. y Gasser, S. (1984) Biochim. Biophys. Acta 779, 65.
- 42) Maarse, A. C.; Van Loon, A. P. G. M.; Riezman, H.; Gregor, I.; Schatz, g. y Grivell, L. A. (1984) EMBO J. 3, 2831.
- 43) Granick, S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 1359.
- 44) Tschudy, D. P.; Welland, F. H.; Collins, A. y Hunter, G. (1964) Metabolism. 13, 396.

- 45) Granick, S. y Kappas, A. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4587.
- 46) Marver, H. S.; Collins, A.; Tschudy, D. P. y Rechcigl, M. Jr. (1966) J. Biol. Chem. 241, 4323.
- 47) Tomita, Y.; Ohashi, A. y Kikuchi, G. (1974) J. Biochem. 75, 1007.
- 48) Kikuchi, G. y Hayashi, N. (1981) Molec. Cell. Biochem. 37, 27.
- 49) Tschudy, D. P.; Perlroth, M. G.; Marver, H. S.; Collins, A.; Hunter, G. Jr. y Rechcigl, M. Jr. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 53, 841.
- 50) Strand, L. J.; Felscher, B. F.; Redeker, A. G. y Marver, H. S. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67, 1315.
- 51) Shemin, D. en The Enzymes, 3^a ed., editado por P. Boyer, vol. 7, pag. 322, Academic Press, New York (1972).
- 52) Shemin, D. (1976) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 273, 109.
- 53) Cheh, A. y Neillands, J. B. (1976) Struct. Bonding 29, 123.
- 54) Akhtar, M. y Jordan, P. M. en Comprehensive Organic Chemistry, editado por W. D. Ollis, Vol. 5, pag. 1121, Pergamon Press, Oxford (1978).
- 55) Battle, A. M. del C.; Ferramola, A. M. y Grinstein, M. (1967) Biochem. J. 104, 244.

- 56) Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. y Sano, S. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 294.
- 57) Wu, W. H.; Shemin, D.; Richards, K. E. y Williams, R. C. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1767.
- 58) van Heyningen, S. y Shemin, D. (1971) Biochemistry 10, 4676.
- 59) Fujita, H.; Orii, Y. y Sano, S. (1981) Biochim. Biophys. Acta 678, 39.
- 60) Bustos, N.; Stella, A. M.; Wider de Xifra, E. A. y Battle, A. M. del C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 745.
- 61) Anderson, P. M. y Desnick, R. J. (1979) J. Biol. Chem., 254, 6924.
- 62) Despaux, N.; Comoy, E.; Bohuon, C. y Boudene, C. (1979) Biochimie 61, 1021.
- 63) Schmid, R. y Shemin, D. (1955) J. Am. Chem. Soc. 77, 506.
- 64) Granick, S. y Mauzerall, D. (1958) J. Biol. Chem. 232, 1119.
- 65) Coleman, D. L. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5511.
- 66) Wilson, E. L.; Burger, P. E. y Dowdle, E. B. (1972) Eur. J. Biochem. 29, 563.
- 67) Chaudry, A. G.; Gore, M. G. y Jordan, P. M. (1976) Biochem. Soc. Trans. 4, 301.

- 68) Barnard, G. F.; Itoh, R.; Hohberger, L. H. y Shemin, D. (1977) J. Biol. Chem. 252, 8965.
- 69) Cheh, A. y Neillands, J. B. (1973) Biochim. Biophys. Res. Commun. 55, 1060.
- 70) Gibbs, P. N. B. y Jordan, P. M. (1981) Biochem. Soc. Trans. 9, 232.
- 71) Nandi, D. L. y Shemin, D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 1236.
- 72) Batlle, M. del C. y Stella, A. M. (1978) Int. J. Biochem. 9, 861.
- 73) Batlle, A. M. del C.; Stella, A. M.; Ferramola, A. M.; Sopena, Y.; Wider de Xifra, E. y Sancovich, H. A. (1978) Int. J. Biochem. 9, 401.
- 74) Nandi, D. L. (1978) Z. Naturforsch. 33, 799.
- 75) Jordan, P. M. y Seehra, J. S. (1980) J. Chem. Soc. Chem. Commun. 240
- 76) Jordan, P. M. y Seehra, J. S. (1980) FEBS Lett. 114, 283.
- 77) Jordan, P. M. y Gibbs, P. N. B. (1985) Biochem. J. 227, 1015.
- 78) Davies, R. C. y Neuberger, A. (1973) Biochem. J. 133, 471.
- 79) Jordan, P. M. y Shemin, D. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1019.

- 80) Williams, C.; Morgan, G. S.; McDonald, E. y Battersby, A. R. (1981) *Biochem. J.* 193, 301.
- 81) Llambías, E. B. y Battle, A. M. del C. (1971) *Biochem. J.* 121, 327.
- 82) Frydman, R. B. y Feinstein, G. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 350, 358.
- 83) Llambías, E. B. C. y Battle, A. M. del C. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 227, 180.
- 84) Piper, W. N. y Van Lier, R. B. L. (1977) *Mol. Pharmacol.* 13, 1126.
- 85) Sancovich, H. A.; Battle, A. M. del C. y Grinstein, M. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 191, 130.
- 86) Higuchi, M. y Bogorad, L. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 244, 401.
- 87) Levin, E. Y. (1968) *Biochemistry* 7, 3781.
- 88) Levin, E. Y. (1971) *Biochemistry* 10, 4669.
- 89) Clement, R. P.; Kohashi, M. y Piper, W. N. (1982) 214, 657.
- 90) Rossetti, M. V. Estudios sobre la ciclotetramerización enzimática del Porfobilinógeno. Su mecanismo. Tesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. (UBA). 1978.

- 91) Feinstein, G. Estudios sobre la Porfobilinógeno Deaminasa y la Uroporfirinógeno III Cosintasa. Tesis Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) 1980.
- 92) Battersby, A. R. y McDonald, E. (1979) Acc. Chem. Res. 12, 14.
- 93) Frydman, B.; Reil, S.; Valasinas, A.; Frydman, R. B. y Rapoport, H. (1971) J. Am. Chem. Soc. 93, 2738.
- 94) Frydman, R. B.; Valasinas, A. y Frydman, B. (1973) Biochemistry 12, 80.
- 95) Frydman, R. B.; Valasinas, A.; Rapoport, H. y Frydman, B. (1972) FEBS Lett. 25, 309.
- 96) Battersby, A. R.; Gibson, K. H.; McDonald, E.; Mander, L. N.; Moron, J. y Nixon, L. N. (1973) J. Chem. Soc. Chem. Commun. 768.
- 97) Battersby, A. R.; Fookes, C. J. R.; Gubtafson-Potter, K.E.; Matcham, G. W. J. y Mc Donald, E. (1979) J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1155.
- 98) Burton, G.; Nordlöv, H.; Hosozawa, S.; Matsumoto, S.; Jordan, P.M.; Fagerness, P. E.; Pryde, L. M. y Scott, A. I. (1979) J. Am. Chem. Soc. 101, 3114.
- 99) Battersby, A. R.; Fookes, C. J. R.; Gustafson-Potter, K. E.; Mc Donald, E. y Matcham, G. W. J. (1982) J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 2427.

- 100) Jordan, P. M. y Berry, A. (1980) FEBS Lett. 112, 86.
- 101) Sehra, J.S. y Jordan, P. M. (1980) J. Am. Chem. Soc. 102, 6841.
- 102) Battersby, A. R.; Fookes, C. J. R.; Matcham, G. W. J.;
Mc Donald, E. y Hollenstein, R. (1983) J. Chem. Soc. Perkin
Trans. I, 3031.
- 103) Jordan, P. M. y Berry, A. (1981) Biochem. J. 195, 177.
- 104) Hart, G. J.; Leeper, F. J. y Battersby, A. R. (1984) Biochem.
J. 222, 93.
- 105) Anderson, P. M. y Desnick, R. J. (1980) J. Biol. Chem. 255,
1993.
- 106) Berry, A.; Jordan, P. M. y Sehra, J. S. (1981) FEBS Lett.
129, 220.
- 107) Jackson, A. H.; Ferramola, A. M.; Sancovich, H. A.; Evans,
N.; Matlin, S. A.; Ryder, D. J. y Smith, S. G. (1976) Ann.
Clin. Res. 8 Suppl. 17, 64.
- 108) Smith, A. G. y Francis, J. E. (1979) Biochem. J. 183, 455.
- 109) Battle, A. M. del C. y Grinstein, M. (1962) Biochim. Biophys.
Acta 62, 197.
- 110) San Martín de Viale, L. C. y Grinstein, M. (1968) Biochim.
Biophys. Acta 158, 79.

- 111) Tomio, J. M.; García, R. C.; San Martín de Viale, L. C. y Grinstein, M. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 198, 353.
- 112) Jackson, A. H.; Sancovich, H. A.; Ferramola, A. M.; Evans, N.; Garnes, D. E.; Matlin, S. A.; Elder, G. H. y Smith, S. G. (1976) *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 273, 191.
- 113) Barnard, G. y Akhtar, M. (1979) *J. C. S. Perkin I* 2354.
- 114) Hoare, D. S. y Heath, H. (1959) *Biochem. J.* 73, 679.
- 115) Mauzerall, D. y Granick, S. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 1141.
- 116) San Martín de Viale, L. C.; García, R. C.; Pisarev, D. K. de; Tomio, J. M. y Grinstein, M. (1969) *FEBS Lett.* 5, 149.
- 117) Romeo, G. E. y Levin, Y. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 230, 330.
- 118) Chen, T. C. y Miller, G. W. (1974) *Pl. Cell. Physiol. Tokyo* 15, 993.
- 119) Aragonés. A.; García, R. C.; San Martín de Viale, L. C.; Tomio, J. M. y Grinstein, M. (1972) *An. Asoc. Quím. Argent.* 60, 239.
- 120) San Martín de Viale, L. C.; Aragonés, A. y Tomio, J. M. (1976) *Acta Physiol. Latinoam.* 26, 403.
- 121) Ríos de Molina, M. del C.; Billi, S.; Wainstok de Calmanovici, R. y San Martín de Viale, L. C. (1984) *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 34, 55.

- 122) Elder, G. H. y Tovey, J. A. (1977) *Biochem. Soc. Trans.* 5, 1470.
- 123) Straka, J. G. y Kushner, J. P. (1983) *Biochemistry* 22, 4664.
- 124) Elder, G. H.; Tovey, S. A. y Sheppard, M. (1983) *Biochem. J.* 215, 46.
- 125) de Verneuil, H.; Sassa, S. y Kappas, A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2454.
- 126) Kawanishi, S.; Seki, Y. y Sano, S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 4285.
- 127) Smith, A. G. y Francis, J. E. (1981) *Biochem. J.* 195, 241.
- 128) Kushner, J. P.; Steinmuller, D. P. y Lee, G. R. (1975) *J. Clin. Invest.* 56, 661.
- 129) Blekkenhorst, G. H.; Eales, L. y Pimstone, N. R. (1979) *S. Afr. Med. J.* 56, 918.
- 130) Woods, J. S.; Kardish, R. y Fowler, B. A. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103, 264.
- 131) Wainstok de Calmanovici, R.; Ríos de Molina, M. C. y San Martín de Viale, L. C. (1985) *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 35, 481.
- 132) Ríos de Molina, M. del C.; Wainstok de Calmanovici, R. y San Martín de Viale, L. C. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 1027.

- 133) Billi, S. C. ; Koss, G. y San Martín de Viale, L. C. (1986) Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 51, 325.
- 134) Meyer, U. A. y Schmid, R. en The metabolic Basis of Inherited Disease, editado por J. B. Stanbury; J. B. Wyngaarden y D.S. Fredrickson, pag. 116, Mc Graw Hill Book Co, New York (1978).
- 135) Pulson, R. y Polglase, W. J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6367.
- 136) Battle, A. M. del C.; Benson, A. y Rimington, C. (1965) Biochem. J. 97, 731.
- 137) Yoshinaga, T. y Sano, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4722.
- 138) Elder, G. H. y Evans, J. D. (1978) Biochem. J. 172, 345.
- 139) Grandchamp, B.; Phung, N. y Nordmann, Y. (1978) Biochem. J. 176, 97.
- 140) Cavaleiro, J. A. S.; Kenner, G. W. y Smith, K. M. (1974) J. Chem. Soc. 1188.
- 141) Elder, G. H.; Evans, J. O.; Jackson, J. R. y Jackson, A. H. (1978) Biochem. J. 169, 215.
- 142) Yoshinaga, T. y Sano, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4727.
- 143) Ehteshamuddin, A. F. M. (1968) Biochem. J. 107, 446.
- 144) Seehra, J. S.; Jordan, P. M. y Akhtar, M. (1983) Biochem. J. 209, 709.

- 145) Zaman, Z. y Akhtar, M. (1976) Eur. J. Biochem. 61 , 215.
- 146) Abboud, M. M. y Akhtar, M. (1978) Nouv. J. Chim. 2, 419.
- 147) Battersby, A. R. (1978) Experientia 34, 1.
- 148) Poulson, R. y Polglase, W. J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1269.
- 149) Poulson, R. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3730.
- 150) Kolarov, J.; Nelson, B. D. y Kuzela, S. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 116, 383.
- 151) Poulson, R. y Polglase, W. J. (1974) FEBS. Lett. 40, 258.
- 152) Deybach, J. C.; Da Silva, V.; Grandchamp, B. y Nordmann, Y. (1985) Eur. J. Biochem. 149, 431.
- 153) Dailey, H. A. Jr. y Lascelles, J. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 160, 523.
- 154) Lochhead, A. C.; Kramer, S. y Goldberg, A. (1963) Br. J. Haematol. 9, 39.
- 155) Porra, R. T. y Jones, O. T. G. (1963) Biochem. J. 87, 181.
- 156) Goldberg, A.; Ashenbrucker, H.; Cartwright, G. E. y Wintrobe, M. M. (1956) Blood. 11, 821.
- 157) Dailey, H. A. (1982) J. Biol. Chem. 257, 14714.

- 158) Taketani, S. y Tokunaga, R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 12748.
- 159) Taketani, S. y Tokunaga, R. (1982) Eur. J. Biochem. 127, 443.
- 160) Dailey, H. A. y Fleming, J. E. (1983) J. Biol. Chem. 258, 11453.
- 161) Tokunaga, R. y Sano, S. (1972) Biochim. Biophys. Acta 264, 263.
- 162) Labbe, R. F. y Hubbard, N. (1961) Biochim. Biophys. Acta 52, 130.
- 163) Dailey, H. A. (1984) J. Biol. Chem. 259, 2711.
- 164) Jones, M. S. y Jones, O. T. G. (1969) Biochem. J. 113, 507.
- 165) Honeybowne, C. L.; Jackson, J. T. y Jones, O. T. G. (1979) FEBS Lett. 98, 207.
- 166) Jones, M. S. y Jones, O. T. G. (1970) Biochem. J. 119, 453.
- 167) Tephly, T. R.; Hasegarva, E. y Baron, J. (1971) Metabolism 20, 200.
- 168) Dailey, H. A. (1977) J. Bacteriol. 132, 302.
- 169) Camadro, J. M. y Labbe, P. (1982) Biochim. Biophys. Acta 707, 280.
- 170) Burhnam, B. F. y Lascelles J. (1963) Biochem. J. 87, 462.
- 171) Wolfson, S. J.; Bartczak, A. y Bloomer, J. R. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3543.

- 172) Jacob, F. y Monod, J. On the regulation of gene activity en Cellular Regulatory Mechanisms, Symp. Quant. Biol. 26, 193,(1961).
- 173) Meyer, U. A. y Schmid, R. Intermittent Acute Porphyria. The enzymatic defect en Brain Disfunction in Metabolic Disorders, editado por F. Plum. Res. Publ. Assoc. Nev. Ment. Dis., vol 53, pag. 211, Reven Press, New York (1974).
- 174) Whiting, M. J. y Granick, S. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1347.
- 175) Sinclair, P. R. y Granick, S. (1975) Ann. N. Y. Acad. Sci. 244, 509.
- 176) Sassa, S. y Granick, S. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 517.
- 177) Strand, L. J.; Manning, J. y Marver, H. S. (1972) J. Biol. Chem. 247, 2820.
- 178) Tyrrell, D. L. J. y Marks, G. S. (1972) Biochem. Pharmacol. 21, 2077.
- 179) Hayashi, N.; Terasawa, M.; Yamauchi, K. y Kikuchi, G. (1980) J. Biochem. 88, 1537.
- 180) Yamamoto, M.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 209, 451.
- 181) Srivastava, G.; Brooker, J. D.; May, B. K. y Elliot, W. H. (1980) Biochem. J. 188, 781

- 182) Badawy, A. A. B. (1979) Biochem. Soc. Trans. 7, 575.
- 183) Granick, S.; Sinclair, P.; Sassa, S. y Grieneringer, G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 9215.
- 184) Sudo, K.; Makino, R.; Tsjuka, T. y Ishimura, Y. en Cytochrome Oxidase editado por T. E. King; Y. Orli; B. Chance y K. Okunuki, pag. 29, Elsevier, North-Holland, Biochemical Press, Amsterdam (1979).
- 185) Kurashina, Y.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1970) J. Biochem. 67, 863.
- 186) Ades, I. Z. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 110, 42.
- 187) Hayashi, N.; Watanabe, N. y Kikuchi, G. (1983) Biochim. Biophys. Res. Commun. 115, 700.
- 188) Wada, O.; Sassa, S.; Takaku, F.; Yano, Y.; Urata, G. y Nakao, K. (1967) Biochim. Biophys. Acta 148 585.
- 189) Bottomly, S. (1968) Biochim. Biophys. Acta 159, 27.
- 190) Wood, J. S. y Dixon, R. L. (1972) Biochem. Pharmacol. 21, 1735.
- 191) Wood, J. S. (1973) Mol. Pharmacology 10, 389.
- 192) Bishop, D. F.; Kitchen, H. y Wood, W. A. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 206, 380.

- 193) Neuwirt, J.; Ponka, P. y Borova, J. (1974) *Enzyme* 17, 100.
- 194) Yamamoto, M.; Yew, N. S.; Federspiel, M.; Dodgson, J. B.; Hayashi, N. y Engel, D. J. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3702.
- 195) Heilmeyer, R.; Clotten, R. y Heilmeyer, L. Jr. *Disturbances in heme synthesis*, Charles C. Thomas, Springfield Ill. (1966).
- 196) Gajdor, A. y Gajdor, T. M. *Porphyrines et porphyrines*, Masson (1969).
- 197) Marks, G. S. *Heme and Chlorophyll, Chemical, Biochemical and Medical Aspects*, D. Van Nostrand. Company Ltd. London (1969).
- 198) De Matteis, F. (1967) *Pharmac. Reviews* 19, 523.
- 199) Beattie, D. S. y Stuchell, R. N. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 291.
- 200) De Matteis, F. (1971) *Biochem. J.* 124, 767.
- 201) De Matteis, F. (1970) *FEBS Lett.* 6, 343.
- 202) Bradshaw, J. J.; Ziman, M. R. y Ivanetich, K. M. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85, 859.
- 203) Ortiz de Montellano, P. R.; Yost, G. S.; Mico, B. A.; Dinizo, S. E.; Correia, M. A. y Kumbara, H. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 524.

- 204) Ortiz de Montellano, P. R. y Mico, B. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 206, 43.
- 205) Lim, L. K.; Srivastava, G.; Brooker, J. D.; May, B. K. y Elliot, W. H. (1980) Biochem. J. 190, 519.
- 206) Rifkind, A. B. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4636.
- 207) Brooker, J. D.; Srivastava, G.; Borthwick, I. A.; May, B. K. y Elliot, W. H. (1983) Eur. J. Biochem. 136, 327.
- 208) Thomas, P. E.; Lu, A. Y. H.; Ryan, D.; West, S. B.; Kawalek, J. y Levin, W. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1385.
- 209) Hanger, D. A.; Coon, M. J. y Nebert, D. W. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1817.
- 210) Johnson, E. F.; Schwarb, G. E. y Müller Eberhard, U. (1979) Mol. Pharmacol. 15, 708.
- 211) Guenguerich, F. P.; Dannan, G. A.; Wright, S. T.; Martín, M. V. y Kaminsky, L. S. (1982) Xenobiotica 12, 701.
- 212) Kaminsky, L. S.; Fasco, M. J. y Guenguerich, F. P. (1979) J. Biol. Chem. 254, 9657.
- 213) Mujano, K.; Fujii, Y. y Toki, S. (1980) Drug. Metab. Disp. 8, 104.

- 214) Dewtsch, J.; Lewtz, J. C.; Yang, S. K.; Gelboin, H. V.; Chiang, Y. L.; Vatsis, K. P. y Coon, M. J. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3123.
- 215) Solomon, H. M. y Figge, F. H. J. (1959) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100, 583.
- 216) De Matteis, F. (1973) Enzyme 16, 266.
- 217) Marks, G. S. The effect of chemicals on hepatic heme biosynthesis en Handbook of Experimental Pharmacology editado por F. De Matteis y W. N. Aldridge; Vol. 44, pag. 201, Springer, Berlin, (1978).
- 218) Onisawa, J. y Labbe, R. F. (1963) J. Biol. Chem. 238, 724.
- 219) De Matteis, F.; Abritti, G. y Gibbs, A. H. (1973) Biochem. J. 134, 717.
- 220) Cole, S. P. C.; Vavasour, E. J. y Marks, G. S. (1979) Biochem. Pharmacol. 28, 3533.
- 221) Tephly, T. R.; Gibbs, A. H. y De Matteis, F. (1979) Biochem. J. 180, 241.
- 222) De Matteis, F.; Gibbs, A. H. y Tephly, T. R. (1980) Biochem. J. 188, 145.
- 223) Ortiz de Montellano, P. R.; Beilan, H. S. y Kunze, K. L. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1490.

- 224) Ortiz de Montellano, P. R.; Kunze, K. L.; Cole, S. P. C. y Marks, G. S. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 1436.
- 225) De Matteis, F.; Gibbs, A. H.; Farmer, P. B. y Lamb, J. H. (1981) FEBS Lett. 129, 328.
- 226) Ortiz de Montellano, P. R.; Beilan, H. S. y Kunze, K. L. (1981) J. Biol. Chem. 256, 6708.
- 227) De Matteis, F.; Jackson, A. H.; Gibbs, A. H.; Rao, K. R. N.; Atton, J.; Weerasinghe, S. y Hollands, C. (1982) FEBS Lett. 142, 44.
- 228) Waterfield, M. D.; Del Favero, A. y Gray, C. H. (1969) Biochim. Biophys. Acta 184, 470.
- 229) Augusto, O.; Beilan, H. S. y Ortiz de Montellano, P. R. (1982) J. Biol. Chem. 257, 11288.
- 230) De Matteis, F.; Hollands, C.; Gibbs, A. H.; de Sa N. y Rizzardini, M. (1982) FEBS Lett. 145, 87.
- 231) Ortiz de Montellano, P. R. y Correia, M. A. (1983) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23, 481.
- 232) Igarashi, J.; Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1976) J. Biochem. 80, 1091.
- 233) Gross, S. R. y Hutton, J. J. (1971) J. Biol. Chem. 246, 606.

- 234) Schmid, R. (1960) N. Engl. J. Med. 263, 397.
- 235) Cam, C. y Nigogoysan, G. (1963) J. A. M. A. 183, 88.
- 236) Ockner, R. K. y Schmid, R. (1961) Nature (Lond.) 189, 449.
- 237) San Martín de Viale, L. C.; Viale, A. A.; Nacht, S. y Grinstein, M. (1970) Clin. Chim. Acta 28, 13.
- 238) San Martín de Viale, L. C.; Ríos de Molina, M. del C.; Wainstok de Calmanovici, R. y Tomio, J.M. (1977) Biochem. J. 168, 393.
- 239) Taljaard, J. J. F.; Shanley, B. C. y Joubert, S. M. (1971) Life Sci. 10, 887.
- 240) Elder, G. H.; Evans, J. O. y Matlin, S. A. (1976) Clin. Sci. Mol. Med. 51, 71.
- 241) Wainstok de Calmanovici, R.; Ríos de Molina, M. del C.; Taira de Yamasato, M. C.; Tomio, J. M. y San Martín de Viale, L. C. (1984) Biochem. J. 218, 753.
- 242) Elder, G. H. y Sheppard, D. M. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 113.
- 243) Felsher, F. B. y Kushner, J. P. (1977) Semin. Hematol. 14, 243.
- 244) Ramsay, C. A.; Magnus, I. A.; Turnbull, A. y Baker, H. (1974) Quant. J. of Med. N. S. 43, 1.

- 245) Welland, F. H. y Carlsen, R. A. (1969) Archs. Derm. 99, 451.
- 246) Saunders, S. J.; Williams, J. y Levey M. (1963) S. Afr. J. Lab. Clin. Med. 9, 277.
- 247) Hanstein, W. G.; Heitman, T. D.; Sandy, A.; Biesterfeldt, H. L.; Liem, H. H. y Müller Eberhard, U. (1981) Biochim. Biophys. Acta 678, 293.
- 248) Kimbrough, R. D.; Linder, R. E. y Gaines, T. B. (1972) Arch. Environ. Health. 25, 354.
- 249) Goldstein, J. A.; Hickman, P.; Bergman, H. y Vos, J. G. (1973) Res. Commun. Chem. Path. Pharmac. 6, 919.
- 250) Smith, A. G. y Francis, J. E. (1983) Biochem. J. 214, 909.
- 251) Louw, M.; Neething, A. C.; Percy, U. A.; Carstens, M. y Shanley, B. C. (1977) Clin. Sci. Molec. Med. 53, 111.
- 252) Koss, G.; Seubert, S.; Seubert, A.; Koransky, W.; Ippen, H. y Straub, M. Chemical porphyria in man, editores J. J. T. W. A. Strik y J. H. Koeman, pag. 175, Elsevier, North Holland Biochemical Press. Amsterdam (1979).
- 253) Sinclair, H. L. y Granick, S. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 124.
- 254) Smith, A. G.; Cabral, J. R. P. y De Matteis, F. (1979) Chem. Biol. Interact. 27, 353.

- 255) Debets, F.; Reinders, J. H.; Koss, G.; Seidel, J. y Strik, A. (1981) Chem. Biol. Interact. 37, 77.
- 256) Tschudy, D. P. y Bonkowsky, H. L. (1972) Fed. Proc. 31, 147.
- 257) Calmanovici, R. W. y S. M. de Viale, L. C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 1039.
- 258) Goldstein, J. A.; Friesen, M.; Linder, R. E.; Hickman, P.; Hass, J. R. y Bergman, H. (1977) Biochem. Pharmacol. 26, 1549.
- 259) Goldstein, J. A.; Hickman, P. y Jue, D. (1974) Toxicol. Appl. Pharmacol. 27, 437.
- 260) Vos, J. G.; Strik, J. J. T. W. A.; Van Holsteÿn, C. M. y Pennings, J. H. (1971) Toxicol. Appl. Pharmacol. 20, 232.
- 261) Kociba, R. J.; Keeler, P. A.; Park, C. N. y Gehring, P. J. (1976) Toxicol. Appl. Pharmacol. 35, 553.
- 262) Poland, A. y Glover, E. (1973) Science 179, 476.
- 263) De Matteis F. (1971) S. Afr. Med. J. 17, 126.
- 264) Taira, M. C. y San Martín de Viale, L. C. (1980) Int. J. Biochem. 12 , 1033.
- 265) Snelson, J. T. (1977) Ecotoxicol. and Environm. Safety. 1, 17.
- 266) Industrial Hygiene and Toxicology (2ª edición) Vol. 2 Toxicology editado por D. W. Fasset y D. D. Irish pag. 1935 (1963).

- 267) Naniba, T. (1971) Bul. W. H. O. 44, 289.
- 268) Myher, B. C. (1973) J. Agr. Food. Chem. 21, 362.
- 269) Racz, W. J. y Marks, G. S. (1969) Biochem. Pharmacol. 18, 2009.
- 270) Rifkind, A. B.; Gilette, P. N.; Song, C. S. y Kappas, A. (1973) J. Pharmac. Exp. Ther. 185, 214.
- 271) Bonkowsky, H. L.; Healey, J. F.; Sinclair, P. R. y Sinclair, J. F. (1985) Biochem. J. 227, 893.
- 272) Healey, J. F.; Bonkowsky, H. L.; Sinclair, P. R. y Sinclair, J. F. (1981) Biochem. J. 198, 595.
- 273) Taub, H.; Krupa, B. y Marks, G. (1976) Biochem. Pharmacol. 25, 511.
- 274) Anderson, K. E. (1978) Biochim. Biophys. Acta 543, 313.
- 275) Umetsu, N.; Grose, F. H.; Allahyari, R.; Abu-El-Haj, S. y Fukuto, T. R. (1977) J. Agric. Food. Chem. 25, 946.
- 276) Marver, H. S.; Tschudy, D. P.; Perlroth, M. G. y Collins, A. (1966) J. Biol. Chem. 241, 2803.
- 277) Mauzerall, D. y Granick, S. (1956) J. Biol. Chem. 219, 435.
- 278) Wainstok de Calmanovici, R., Porfiria Experimental por hexa-clorobenzeno. Estudios sobre el mecanismo de producción de la porfiria. Tesis Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) 1982.

- 279) Kim, H. J. y Kikuchi, G. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 164, 293.
- 280) Correia, M. A. y Meyer, U. A. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72 , 400.
- 281) Petersons, M. y Allred, J. B. (1981) Physiol. Chem. & Physics. 13, 473.
- 282) Gibson, J.; Upper, C. D. y Gunsalus, I. C. (1967) J. Biol. Chem. 242, 2474.
- 283) Kaufman, S. en Methods in Enzymology editado por S. P. Colowick y N. O. Kaplan, Vol. 1, pag. 718, Academic Press, New York (1955).
- 284) Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
- 285) Lipmann, F. y Tuttle, C. (1945) J. Biol. Chem. 159, 21.
- 286) Pennington, R. J. (1961) Biochem. J. 80, 649.
- 287) Beaufay, H.; Bendall, D. S.; Baudhuin, P. y De Duve, C. (1959) Biochem. J. 73, 623.
- 288) Porra, R. J.; Vitols, K. S.; Labbe, R. F. y Newton, N. A. (1967) Biochem. J. 104, 321.
- 289) Falk, J. E. en Porphyrins and Metalloporphyrins, pag. 236, Amsterdam, London y New York, Elsevier Publishing Co (1964).

- 290) Piper, W. N.; Condie, L. W. y Tephly, T. R. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 159, 671.
- 291) Tomio, J. M. y San Martín de Viale, L. C. (1972) Bioq. Clin. 6, 217.
- 292) Rimington, C. y Sveinsson, S. L. (1950) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 2, 209.
- 293) Holti, G.; Rimington, C.; Tate, B. C. y Garfield, T. (1958) Quart. J. Med. N. S. 27, 1.
- 294) Rimington, C. (1961) Association of Clinical Pathologists, Broad Sheet Nº 36.
- 295) García, R.; San Martín de Viale, L. C.; Tomio, J. M. y Grinstein, M. (1973) Biochim. Biophys. Acta 309, 203.
- 296) Fisher, H. y Stern, A. (1940) Die Chemie des Pyrroles, Leipzig, 2 pt. 2, 420.
- 297) San Martín de Viale, L. C. Biosíntesis del hemo. Purificación y caracterización de las porfirinas urinarias en porfiria humana y experimental. Porfirinógenos de 5- y 6- COOH (isómero III) como intermediarios normales en la síntesis del hemo. Tesis Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) 1970.
- 298) Falk, J. E. y Benson, A. (1953) Biochem. J. 55, 101.

- 299) Salum, J.; Battle, A. M. del C. y Grinstein, M. (1961) *Anales Asoc. Quím. Arg.* 49, 3.
- 300) Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*, pag. 124, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1969).
- 301) Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*, pag. 392, W.H. Freeman and Company, San Francisco (1969).
- 302) Doss, M. (1970) *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 8, 197.
- 303) Narayan, S. y Misra, U. K. (1985) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 24.
- 304) Anders, M. W. y Mannering, G. J. (1966) *Mol. Pharmacol.* 2, 319.
- 305) Sinclair, P. R.; Bement, W. J.; Konkovsky, H. L. y Sinclair, J. F. (1984) *Biochem. J.* 222, 737.
- 306) Koeman, J. H.; Debets, F. M. H. y Strik, J. J. T. W. A. *The porphyrinogenic potential of pesticides with special emphasis on organophosphorous compounds*, editado por W. F. Tordoir y E. A. H. Van Hemmstra -Lequin, *Studies in Environmental Science*, Vol. 7, pag: 157, *Field Worker Exposure During pesticide Application*, Elsevier, North Holland (1980).

- 307) Simon, N. y Siklósi, Cs. (1974) Z. Hautkr. 49, 497.
- 308) Kreimer-Birbaum, M.; M. Grinstein (1965) Biochim. Biophys. Acta 3, 110.
- 309) Kószó, F.; Horváth, L. I.; Simon, N.; Siklósi, Cs. y Kiss, M. (1982) Biochem. Pharmacol. 31, 11.
- 310) Debets, F. M. H.; Hamers, W. J. H. M. B. y Strik, J. J.T. W. A. (1980) Int. J. Biochem. 12, 1019.
- 311) Kerklaan, P. R. M.; Strik, J. J. T. W. A. y Koeman, J. H. Toxicity of hexachlorobenzene with special reference to hepatic glutathione levels, liver necrosis, hepatic porphyria and metabolites of hexachlorobenzene in female rats fed hexachlorobenzene and treated with phenobarbital and diethylmaleate; en Chemical Porphyria in man, editado por: J. J. T. W. A. Strik y J. H. Koeman, pag. 151, Elsevier, North-Holland, Amsterdam (1979).
- 312) Engst, R.; Macholz, R. M. y Kujawa, M. (1979) Gig. Sanit. 10, 64.
- 313) Nakajima, E.; Shindo, H. y Kurihara, N. (1970) Radioisotopes 19, 538.
- 314) Hangen, T. H. y Heath, E. C. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2689.
- 315) Brown, T. L. y Wold, F. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10743.